

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. F. Großmann

**Biologische und serologische Untersuchungen
an verschiedenen
Isolaten des Gurkenmosaikvirus 1**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Diplom-Agraringenieurin Ülkü İzgi
aus Nazilli/Türkei

Gießen 1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Phytopathologie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktor: Professor Dr. F. Großmann

**Biologische und serologische Untersuchungen
an verschiedenen
Isolaten des Gurkenmosaikvirus 1**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Landwirtschaftlichen Fakultät
der Justus Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Diplom-Agraringenieurin Ulkü Izgi
aus Nazilli/Türkei

Gießen 1969



D e k a n : Professor Dr. F. Großmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. F. Großmann

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Glathe

Tag der mündlichen Prüfung: 29.8.1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG</u>	1
2. <u>LITERATURÜBERSICHT</u>	4
2.1. Nomenklatur	4
2.2. Wirtspflanzenkreis und Symptome	4
2.3. Testpflanzen und Differentialdiagnose	6
2.4. Übertragung	8
2.4.1. Mechanische Übertragung	8
2.4.2. Übertragung durch Aphiden	9
2.4.3. Übertragung durch Samen	9
2.4.4. Übertragung durch Cuscuta	10
2.5. Geographische Verbreitung	10
2.6. Epidemiologie und Bekämpfung	10
2.7. Wirtschaftliche Bedeutung	11
2.8. Physikalische Eigenschaften	12
2.8.1. Verdünnungsendpunkt	12
2.8.2. Thermale Inaktivierung	12
2.8.3. Beständigkeit in getrockneten Blättern	12
2.8.4. Partikelgröße	12
2.8.5. Sedimentationskonstante	13
2.8.6. RNS-Gehalt, Basenzusammensetzung und Hüllprotein	13
2.9. Serologie	14
3. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16
3.1. Test- und Wirtspflanzen	16
3.2. Testverfahren	16
3.3. Virus-Isolate	17
3.4. Charakterisierung der Virus-Isolate auf Testpflanzen	18
3.5. Virusvermehrung	18

	Seite
3.6. Bestimmung der physikalischen Eigenschaften	19
3.6.1. Verdünnungsendpunkt	19
3.6.2. Thermale Inaktivierung	19
3.6.3. Bestimmung der Beständigkeit in vitro	20
3.7. Virusreinigung	20
3.7.1. Reinigungsmethode nach SCOTT	20
3.7.2. Differential-Ultrazentrifugation	24
3.8. Dichtegradienten-Zentrifugation	24
3.9. Spektralphotometrische Messungen	25
3.9.1. U.V.-Absorptionsspektrum	25
3.9.2. Feststellung der Virusaussbeute	26
3.10. Serologische Untersuchungen	26
3.10.1. Herstellung des Antiserums	26
3.10.2. Geldiffusionstest	26
3.10.3. Kreuzabsorptionsteste zur Feststellung der Verwandtschaftsverhältnisse	27
3.11. Elektronenmikroskopie	27
4. <u>ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN</u>	30
4.1. Testpflanzen-system	30
4.1.1. Testpflanzen, die mit Lokalläsionen reagieren	30
4.1.2. Testpflanzen, die systemisch reagieren	32
4.2. Physikalische Eigenschaften	35
4.2.1. Verdünnungsendpunkt	35
4.2.2. Thermale Inaktivierung	35
4.2.3. Beständigkeit in vitro	38

	Seite
4.3. Virusreinigung	40
4.3.1. Vergleich verschiedener Reinigungsmethoden	40
4.3.2. Feststellung des geeigneten Puffermediums für Isolat GT	42
4.4. Bestimmung der spektralen Absorptions- kurve	44
4.5. Virusaussbeuten	46
4.6. Serologische Untersuchungen	46
4.6.1. Homologe Teste	47
4.6.2. Heterologe Teste	54
4.6.3. Kreuzabsorptionsteste	59
4.6.4. Serologischer Nachweis des GMV in Pflanzensäften	61
4.6.5. Versuche zum Nachweis der Natur der multiplen Präzipitations- linien	67
4.7. Dichtegradienten-Zentrifugation und Dichtegradienten-Fraktionierung	71
4.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	73
5. <u>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</u>	77
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	85
7. <u>LITERATUR</u>	87

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit werden biologische und serologische Untersuchungen an vier verschiedenen Gurkenmosaikvirus-Isolaten und zwei weiteren Virus-Isolaten beschrieben. Mehrere Gründe haben zur Durchführung dieser Untersuchungen geführt. Das Gurkenmosaikvirus (GMV) ist seit Beginn dieses Jahrhunderts bekannt und als Krankheitserreger sehr verbreitet. Sein Wirtspflanzenkreis ist ungewöhnlich groß und man findet es daher bei fast allen wichtigen Kultur- und Zierpflanzen aus den Familien der Cucurbitaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Umbellifereae, Cruciferae, Compositae, Leguminosae, Musaceae und Liliaceae. Der Schwerpunkt seiner Verbreitung liegt im Umkreis von Siedlungsgebieten, da dort viele verschiedene Zier- und Kulturpflanzen nebeneinander angebaut werden, die als Wirte bzw. als Infektionsreservoir für das GMV dienen können. Nach verschiedenen Berichten können die Ertragseinbußen, die das GMV verursacht, in manchen Kulturen bis zu 90 % betragen.

Die Symptome, die das GMV hervorruft, sind meist mosaikartige Scheckungen und Aufhellungen. Findet man jedoch Pflanzen mit solchen Symptomen, so ist es auf Grund der relativ geringen Symptom-Spezifität nicht ohne weiteres möglich, Rückschlüsse auf die Natur des symptomauslösenden Virus zu ziehen. Vielmehr können sehr ähnliche Symptome auch z.B. durch das Wildgurkenmosaik-Virus, das Squash mosaic virus, das Kartoffel-X-Virus und das Tabakmosaik-Virus bei den gleichen Pflanzen hervorgerufen werden. Das bedeutet, daß in vielen Fällen die Identifizierung des GMV selbst mit Hilfe von Testpflanzen nicht hinreichend gelingt. Da nichtverwandte Viren

an einigen der üblichen Testpflanzen annähernd gleiche Symptome verursachen können, sind meist recht umständliche und zeitraubende Tests mit den entsprechenden Differentialwirten nötig. Ein Ausweg aus diesen Schwierigkeiten wäre der Nachweis des GMV mit Hilfe serologischer Methoden. Diese Technik erlaubt eine sichere, schnelle und relativ einfache Bestimmung. Außerdem ist sie in der Praxis gut anwendbar, wenn die entsprechenden Antiseren zur Verfügung stehen. Eigenartigerweise gibt es aber bisher nur relativ wenige serologische Untersuchungen über das GMV. Der Hauptgrund dafür dürfte in den Schwierigkeiten zu suchen sein, die früher bei der Reinigung des GMV auftraten. Für die Herstellung von brauchbaren Antiseren sind hochgereinigte Viruspräparate eine Grundvoraussetzung; ihre Herstellung ist erst in den letzten Jahren möglich geworden. Zusätzliche Probleme können u.a. auch dadurch entstehen, daß in der Pflanze oft eine zu geringe Virusmenge vorhanden ist oder daß die Viruskonzentration sehr stark von Umweltfaktoren beeinflusst wird. Es ist daher nicht verwunderlich, daß das GMV erst in allerjüngster Zeit in den USA, in Australien, und in Südafrika serologisch bearbeitet werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde je ein Virus-Isolat von Paprika und Gurke aus der Türkei mituntersucht, bei denen der Verdacht bestand, daß es sich um Isolate des GMV handeln könnte. Das Ziel der eigenen Untersuchungen war es, verschiedene in der Literatur bereits beschriebene GMV-Isolate serologisch miteinander zu vergleichen und dabei mit Hilfe serologischer Methoden die Natur der türkischen Virus-Isolate festzustellen. Weiterhin wurde versucht, geeignete Reinigungsmethoden für die entsprechenden Isolate zu finden, welche die größte Virusausschüttung lieferten, um damit eine der Schwierig-

keiten für eine Antiserum-Herstellung auszuräumen.
Schließlich sollten die Voraussetzungen für eine
Anwendung des serologischen Nachweises des GMV unter
Bedingungen der Praxis erarbeitet werden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Nomenklatur

Die wichtigsten in der Literatur verwendeten Synonyme für das GMV sind: Cucumber mosaic virus, Ordinary cucumber mosaic virus, Marmor cucumeris var. vulgare HOLMES, Cucumis virus I (DOOLITTLE) SMITH, Cucumber yellow mosaic virus, Calico of cucumber and melon, Hiyar mozayigi virusu (Türkisch). Als zum Gurkenmosaik gehörig erwiesen sich auch das Spinach mosaic virus und das Tomato fern leaf virus.

Einen besonderen Hinweis verdienen die beiden Viren Cucumber virus 3 und Cucumber virus 4, bei denen es sich um besondere Stämme des Tabakmosaikvirus (KNIGHT, 1955) und keinesfalls um Isolate des klassischen Gurkenmosaikvirus 1 handelt.

2.2. Wirtspflanzenkreis und Symptome

Der Wirtspflanzenkreis des GMV ist sehr groß; er umfaßt ungefähr 300 Arten aus fast allen Pflanzenfamilien (KLINKOWSKI und USCHDRAWAIT, 1968).

Symptome an den wichtigsten Kulturpflanzen

Gurke: An der Gurke verursacht das GMV eine mehr oder weniger ausgeprägte, meist aber diffuse Scheckung. Das typische Mosaik kommt besonders an den jüngeren Blättern vor. Die Blätter sind weiterhin oft verkleinert und die Triebe gestaucht und rosettenartig ausgebildet. Mit zunehmendem Alter der Blätter werden die Symptome schwächer. Kranke Pflanzen haben weniger Blüten. Die Symptome an den Früchten sind meistens sehr variabel und reichen von Scheckungen bis im Extremfall zu farblosen, warzenartigen Deformationen.

Die Fruchtsymptome treten allerdings nur auf, wenn die Temperatur mindestens 27 °C beträgt (KÖHLER und KLINKOWSKI, 1954).

Tomate: Die Krankheit an der Tomate bezeichnet man als "einfache Farnblättrigkeit" (fern leaf). Sie wird meist durch das GMV verursacht, kann aber auch durch das TMV hervorgerufen werden. Die Pflanzen zeigen chlorotische Fleckung und die Blattlamina sind verschmälert, so daß die Blätter draht- oder rankenförmige Formen annehmen können (Schuhnestel, shoe string). Die Stärke und Ausprägung dieses Symptombildes wird sehr stark durch Umweltbedingungen beeinflusst.

Paprika: Nach KOVACHEVSKY (1942) erzeugt das gewöhnliche Gurkenmosaikvirus die Reisigkrankheit der Paprika (rosette-disease, Ujhitu, wtruntschwane oder kurtschinjaswane, acriciamento, kustistost). Die Pflanzen haben ein rosettenartiges Aussehen, da die Internodien verkürzt und die Sprosse dicht belaubt sind. Die Blätter sind verschmälert, unsymmetrisch ausgebildet und gelblichgrün bis chlorotisch verfärbt. Die Früchte sind sehr oft mißgebildet und gelegentlich mit mosaikartigen Flecken gemustert. Der Ertrag ist stark vermindert und beträgt in manchen Fällen nur noch 10 % der normalen Ernte.

Kürbis:

Cucurbita pepo: Frühzeitig infizierte Pflanzen zeigen nach SCHMELZER (1967) Mosaik und Kräuselung. Die Früchte sind klein und nicht walzenförmig ausgebildet wie normale Früchte. Die Fruchtoberfläche ist uneben. Bei Spätinfektionen treten Chlorosen und hell- bis dunkelgrüne Scheckungen auf und sehr oft kommt es zu Welken und Nekrosen, wobei das Sproßsystem völlig vertrocknen kann.

Cucurbita maxima: Auch an dieser Kürbisart kann man ähnlich wie an den spät infizierten Cucurbita pepo-Pflanzen nach SCHMELZER (1967) Welke und Absterbeerscheinungen beobachten. Die Früchte sind in charakteristischer Weise deutlich gefleckt und mit Vertiefungen bedeckt. Die Vertiefungen können grünlich bis schwärzlich gefärbt sein und sich dadurch von dem gelb- bis orangefarbigem normalen Rindengewebe unterscheiden.

Spinat: Die Symptome des GMV an Spinat sind je nach dem Virusstamm von unterschiedlicher Intensität. Kennzeichnend ist nach KÖHLER und KLINKOWSKI (1954) für das GMV eine Chlorose, die allmählich in eine Vergilbung der jüngeren Blätter übergeht. Bei besonders pathogenen Stämmen bleiben die Spinatpflanzen im Wuchs zurück und es kommen Kräuselungen, sowie stärkere Deformierungen der jüngeren Blätter vor. Im späteren Stadium sterben die Blätter meist vorzeitig ab.

2.3. Testpflanzen und Differentialdiagnose

Im folgenden sollen die wichtigsten Testpflanzen besprochen werden, die zur Identifizierung der GMV-Isolate dienen können.

Chenopodium quinoa L.: Nach USCHDRAWIT (1955) ist Chenopodium quinoa eine schnell und spezifisch reagierende und daher sehr geeignete Testpflanze für GMV. Die Blätter zeigen bereits 48 Stunden nach der Infektion deutliche Lokalläsionen, die etwa nach vier Tagen nekrotisch werden. Diese Lokalläsionen haben eine helle Mitte, einen braungelben, nekrotischen Ring und eine chlorotische Zone von 2 bis 3 mm Durchmesser. Die infizierten Pflanzen erkranken jedoch nicht systemisch.

Chenopodium amaranticolor L.: Die infizierten Blätter reagieren erst 3 bis 5 Tage nach der Inokulation mit kleinen nadelstichgroßen Lokalläsionen, die zwischen dem 6. bis 8. Tage p.i. nekrotisch werden und sich nur bis zu 1 mm Durchmesser vergrößern. Eine systemische Erkrankung bleibt aus (HOLLINGS, 1956).

Spinacia oleracea L.: 8 bis 10 Tage nach der Inokulation zeigen die Blätter eine gelbfleckige Aufhellung der Interkostalfelder und die sich neu entfaltenden Blätter sind zudem meistens deformiert. Die Gelbfärbung der äußeren Blätter geht auf die inneren Blätter über. Die Pflanzen bleiben im Wachstum zurück oder sterben etwa vier Wochen nach der Inokulation sogar ab.

Vicia faba L. minor: 4 bis 6 Tage nach der Infektion bilden sich etwa 2 mm große, runde, dunkelbraune Lokalläsionen aus, die sich nicht vergrößern. Eine systemische Erkrankung der Pflanze tritt nicht ein.

Vigna sinensis L. : SILL und WALKER (1952) fanden zum ersten Mal, daß Vigna sinensis L. als Testpflanze benutzt werden kann. 2 bis 6 Tage nach der Infektion mit GMV zeigen die Primärblätter punktförmige nekrotische, dunkelbraun gefärbte Lokalläsionen, die sich kaum verändern oder vergrößern. Die Infektion bleibt normalerweise auf die Läsionen beschränkt. Lediglich bei einigen besonderen Isolaten (z.B. GMV- W 14) kann eine systemische Erkrankung der neu zuwachsenden Blätter eintreten, die sich dann in Mosaiksymptomen und Deformationen äußert.

Cucumis sativus L. Sorte Delikateß: 4 bis 5 Tage nach der Inokulation der Kotyledonen sind 3 bis 4 mm große, weißlich-grüne Flecken zu beobachten, die auf

beiden Blattseiten sichtbar sind. Die sich neu entfaltenden Laubblätter zeigen 1 bis 2 mm große, gelblich-grüne Flecken. 10 bis 12 Tage nach der Inokulation ist ein deutliches Mosaik zu erkennen.

Nicotiana glutinosa L.: Die infizierten Blätter weisen keinerlei Symptome auf, aber 6 bis 7 Tage nach der Abreibung zeigt sich eine systemische Infektion in Form von Adernaufhellung und Gelbfärbung. Infolge der Einwanderung des Virus in voll ausgebildete Blätter kommen oft eichenblattähnliche Zeichnungen zustande, die dann meistens von Nekrosen umgrenzt sind. Die Pflanzen bleiben im Wachstum zurück und die Blätter zeigen verschiedene Anomalien wie z.B. starke Verkrümmungen, Aufbeulungen und Verschmälerungen.

Nicotiana tabacum L. Sorten "Samsun" und "Xanthi nc.":

Die primärinfizierten Blätter zeigen nur gelegentlich Symptome in Form von fahlen, hellgrünen bis gelben diffusen Flecken. In manchen Fällen können diese Flecken von schwachen Nekrosen umgrenzt sein. Meistens ist jedoch das erste Anzeichen einer stattgefundenen Infektion eine diffuse Adernaufhellung an den jüngsten Blättern. Zwei Wochen nach der Infektion kann sich diese Adernaufhellung zu einer Adernbänderung umbilden. In vielen Fällen sind die neu zuwachsenden Blätter verschmälert, verkürzt und unsymmetrisch ausgebildet. Das Symptombild auf Samsun-Tabak entspricht dem auf Xanthi-Tabak völlig.

2.4. Übertragung

2.4.1. Mechanische Übertragung

Das GMV ist hochinfektiös und die meisten Isolate lassen sich leicht durch Abreibung mit infektiösem Preßsaft übertragen, wobei der Infektionserfolg sehr stark von der Temperatur abhängig ist (KASSANIS, 1952).

Andererseits sind gelegentlich instabile Isolate des GMV beschrieben worden, deren mechanische Übertragung Schwierigkeiten bereitete, so daß spezielle Übertragungstechniken angewendet werden mußten (SCHLEGEL, 1960; SÄNGER und GOLD, 1962).

2.4.2. Übertragung durch Aphiden

Das GMV gehört zu den nichtpersistenten Viren, die stechborstenbürtig durch Aphiden übertragen werden. Nach HEINZE (1952) sind eine sehr große Zahl Blattlausarten als "Normalüberträger" oder aber als "Gelegenheitsüberträger" bei der Übertragung des GMV beteiligt. Entsprechend dem stechborstenbürtigen Übertragungsmodus nimmt mit zunehmender Dauer der Wartezeit zwischen Virusaufnahme und Weiterübertragung die Übertragungschance sehr schnell ab. Nach einer Wartezeit von 20 bis 30 Minuten wird das GMV daher nicht mehr übertragen (FORGHANI, 1966).

2.4.3. Übertragung durch Samen

Die Übertragung des Virus durch Samen ist noch umstritten und wurde bis jetzt nur für einige wenige Wirtspflanzen berichtet. DOOLITTLE und WALKER (1925) stellten eine Samenübertragung bei Micrampelis lobata (Greene) fest. BEWLEY und CORBETT (1930) fanden eine Samenübertragung bei Treibhausgurken und CHAMBERLAIN (1939, 1948) bei Cucumis melo L. und Cyphomandra betacea Sendtn. Nach KOVACHEVSKY (1942) und SUTIC (1959) soll bei Paprika nur sehr selten eine Samenübertragung vorkommen, während SZIRMAI (1948) berichtet, daß 16 bis 18 % kranker Pflanzen durch Samenübertragung auftreten können. Demgegenüber konnte eine Übertragung des GMV durch Samen weder bei Galinsoga parviflora und Mercurialis annua (HEINE, 1957) noch bei Ölkürbis (FORGHANI et al., 1966) beobachtet werden.

2.4.4. Übertragung durch Cuscuta

Über eine Übertragung des GMV durch Cuscuta-Arten berichten mehrere Autoren (BENNETT, 1940, 1944; COSTA, 1944; HILDEBRAND, 1945). So übertrugen von acht geprüften Cuscuta-Arten sieben einen Grünstamm des GMV regelmäßig (SCHMELZER, 1957). Cuscuta-Arten haben sich auch als natürliche Wirte des GMV erwiesen, welches bei ihnen sogar gewisse Krankheitserscheinungen verursachen kann. Die Übertragung des GMV durch Cuscuta war in den Anfängen der Pflanzenvirologie von wissenschaftlichem Interesse. Sie ist für die Praxis allerdings stets von untergeordneter Bedeutung gewesen.

2.5. Geographische Verbreitung

Da das GMV einen großen Wirtspflanzenkreis hat und durch Aphiden übertragen wird, ist es naturgemäß sehr weit verbreitet. Es ist ein Kosmopolit unter den Pflanzenviren und daher überall in Amerika, Europa, Asien, Australien und Afrika sowohl an Wildpflanzen als auch bei Kulturpflanzen anzutreffen.

2.6. Epidemiologie und Bekämpfung

Sowohl die Infektion mit dem GMV als auch das Schadbild, welches anschließend verursacht wird, sind von der Temperatur abhängig. Nach TJALLINGII (1952) besteht zwischen der virusbedingten Welke bzw. Nekrose bei Gurke und dem Wetter eine enge Beziehung. Es dauert normalerweise ungefähr 14 Tage, bis die Symptome sichtbar werden. Die Temperatur während der zweiten Hälfte dieser Zeit ist entscheidend für die Art der Symptome. In 10 cm Höhe über dem Erdboden gemessene Tagestemperaturmaxima unter 20 °C verursachen eine Welke, bei Temperaturen zwischen 20 bis 25 °C treten Nekrosen und Scheckungen auf, während bei Werten über 25 °C Mosaiksymptome erscheinen.

So wie es für aphiden-übertragbare Viren charakteristisch ist, tritt die Erkrankung mit dem GMV auf dem Feld in unregelmäßigen Nestern, bevorzugt an den Randpartien, auf und breitet sich dann anschließend sehr schnell aus. Nach FORGHANI (1966) ist etwa 3 bis 4 Wochen nach der Aussaat nur 0,03 % des Bestandes infiziert. Nach etwa 14 bis 16 Wochen sind aber bereits 30 bis 40 % der Pflanzen virusverseucht. Nach diesem Zeitpunkt ist dann keine wesentliche Erhöhung des Prozentsatzes viruskranker Pflanzen mehr zu beobachten. Da das GMV ein aphiden-übertragbares Virus ist, läßt sich seine Ausbreitung in einem Feldbestand weitgehend ausschalten, wenn man eine regelmäßige Blattlausbekämpfung durchführt. Demgegenüber spielt der Anbau resistenter Sorten eine sehr viel geringere Rolle. Bestimmte ostasiatische Gurkenherkünfte und -kreuzungen haben eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegenüber GMV-Befall und zeigen schwächere Symptome als anfällige Sorten. Als resistente Sorten gelten "Chinesische long" und "Tokyo long". Nach SCHMELZER und NAUMANN (1966) ist eine Randbepflanzung gefährdeter Kulturen mit Mais, Hirse oder anderen Gramineen zu empfehlen, weil diese für das GMV nur wenig oder gar nicht anfällig sind. Da die Blattläuse zuerst diese als Wirtspflanzen ungeeigneten Randpflanzen anfliegen und dabei durch Probesaugstiche das Virus abgeben, wird die Weiterübertragung des Virus in den Bestand sehr stark reduziert.

2.7. Wirtschaftliche Bedeutung

In der Einleitung wurde bereits kurz erwähnt, daß das GMV großen Schaden verursachen kann. Nach KOVACHEVSKY (1942) sind bei Paprika 100 % erkrankte Pflanzen und bis zu 90 % Ertragsverluste nicht selten. SCHMELZER und NAUMANN (1966) fanden bei Gurken (Sorte

Delikates) 42, 5 % mosaikkranke Pflanzen, von denen 13,5 % bereits abgestorben waren. Das GMV verursacht naturgemäß besonders große Schäden in Jahren mit starkem Blattlausbefall.

2.8. Physikalische Eigenschaften

2.8.1. Verdünnungsendpunkt

Die in der Literatur angegebenen Werte für den Endpunkt der Verdünnung liegen zwischen 1 : 1000 und 1 : 1.000 000. Eine solche große Schwankungsbreite ist nicht ungewöhnlich und läßt sich sowohl durch die Verschiedenheit der Stämme als auch durch die oft sehr unterschiedliche Viruskonzentration des Testmaterials erklären.

2.8.2. Thermale Inaktivierung

Die Werte, die von verschiedenen Autoren ermittelt worden sind, liegen zwischen 60 bis 80 °C. Der Grund dafür kann ebenfalls sowohl durch methodische Unterschiede bei den Testverfahren als auch durch Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen erklärt werden.

2.8.3. Beständigkeit in getrockneten Blättern

Nach manchen Autoren geht die Infektiosität des GMV in getrockneten Blättern verloren (DOOLITTLE, 1920; SMITH, 1957), während sie nach anderen Angaben noch nach 3 Tagen (TJALLINGII, 1952) und sogar nach mehr als einem Jahr (RAINIO, 1941) nachweisbar sein soll.

2.8.4. Partikelgröße

Das GMV ist ein polyedrisches Virus und die Angaben über seine Partikelgröße sind unterschiedlich. Nach SILL et al. (1952) beträgt die mittlere Partikel-

größe 35 nm und GÜNTÜRK et al. (1957) stellten eine Partikelgröße von 40 nm für GMV im Spinat fest. TOMLINSON et al. (1959) fanden einen Durchmesser von 40 nm, der nach VAN REGENMORTEL (1961) und nach SCOTT (1963) allerdings nur 28 bis 30 nm betragen soll. BETTO et al. (1964) stellten schließlich fest, daß die mittlere Partikelgröße in negativ kontrastierten Präparaten 29 nm und bei Metallbedampften Partikeln 36 nm beträgt. Die jüngsten Werte stammen von FRANCKI et al. (1966), die für negativkontrastierte Partikel des Isolates Q einen Durchmesser von ca. 28 nm fanden und nach Bedampfung mit Gold-Palladium ca. 42 nm messen konnten.

2.8.5. Sedimentationskonstante

Die Sedimentationskonstante des GMV beträgt
nach TOMLINSON et al. (1959) = 101 S,
nach KAPER et al. (1965) = 92 S,
nach FRANCKI et al. (1966) = 98,6 S und
nach VAN REGENMORTEL (1967) = 98,5 S,
so daß ein mittlerer Wert von ca. 98 S angenommen werden kann.

2.8.6. RNS-Gehalt, Basenzusammensetzung und Hüllprotein

Der RNS-Gehalt der Partikel des Y-Stammes des GMV beträgt nach KAPER et al. (1965) 18,5 %; für die Basenzusammensetzung werden folgende Werte angegeben: Adenin = 24,3 %, Guanin = 23,4 %, Cytosin = 23,2 % und Uracil = 29,0 %. Nach FRANCKI et al. (1966) ist der RNS-Gehalt beim Q-Stamm ebenfalls 18,0 % und die Basenzusammensetzung beträgt für Adenin = 22,4 %, Guanin = 24,7 %, Cytosin = 22,8 % und Uracil = 30,1 %. Die ersten Daten über das GMV-Hüllprotein wurden von VAN REGENMORTEL (1967) für den Stamm S publiziert. Die Hüllprotein-Untereinheit ist eine Polypeptidkette von wahrscheinlich 287 Aminosäuren mit einem

Molekulargewicht von 32.200, und man kann annehmen, daß 176 bis 182 dieser Untereinheiten die Proteinhülle des polyedrischen Partikels bilden.

2.9. Serologie

Die ersten serologischen Untersuchungen wurden von NOORDAM (1952) durchgeführt. Er konnte eine serologische Verwandtschaft zwischen dem Gelbstamm des GMV (= Cucumis Virus 1 Nr. 6 von Price) und einem Virus-Isolat von Chrysanthemen nachweisen. FRANKI et al. (1966) zeigten, daß ein australisches Isolat des GMV aus Queensland (GMV-Q), welches aus Capsicum isoliert worden war, serologisch mit dem GMV-Y aus den USA verwandt ist. Eine enge serologische Verwandtschaft wurde ebenfalls zwischen dem GMV-Y und einem südafrikanischen GMV-Isolat aus Squash (dem GMV-S) von VAN REGENMORTEL (1966) festgestellt, während TREMAINE (1966, 1968) zeigte, daß auch ein Virus-Isolat aus Prunus mit dem Stamm Y serologisch verwandt ist. MUELLER (1966) identifizierte mit Hilfe der Serologie ein Virus-Isolat aus mosaikkranken Canna-Pflanzen als GMV, und nach KAHN und SCOTT (1964) erwiesen sich 13 von 26 Virus-Isolaten, welche bei Amaryllis Mosaik-Symptome hervorriefen, als serologisch mit dem GMV verwandt. Von ORELLENA und QUACQUARELLI (1968) wurde schließlich eine serologische Verwandtschaft zwischen dem Sunflower mosaic Virus sowie einem Virus-Isolat von Passiflora coerulea L. (GMV-PS) und dem GMV-Y festgestellt.

Ein besonders schwieriges Problem ist in diesem Zusammenhang die Frage der Beziehungen zwischen dem GMV und dem Tomaten-Aspermie-Virus (TAV). Das TAV wurde von BLENCOWE und CALDWELL (1949) aus Tomaten isoliert; sie vermuteten allerdings, daß es ursprünglich von Chrysanthemen herstammte, von denen

aus die Tomaten infiziert worden waren. Die Resultate mancher Untersuchungen zeigten nun, daß das GMV und das TAV nicht miteinander verwandt sind (BLENCOWE und CALDWELL, 1949; HOLLINGS, 1955; GOVIER, 1957; GROGAN et al., 1963), während die Ergebnisse anderer Arbeiten Hinweise dafür lieferten, daß beide Viren doch zur gleichen Gruppe gehören müssen (GRAHAM, 1957; VAN SLOGTEREN, 1958). Diese Diskrepanz konnte schließlich mit Hilfe der Serologie durch LAWSON (1967) aufgeklärt werden. Er fand gemeinsame antigene Determinanten zwischen bestimmten Isolaten des GMV und des TAV, so daß das TAV jetzt als ein besonderer Stamm des GMV angesehen werden kann.

3. MATERIAL UND METHODEN

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Phytopathologie der Justus Liebig-Universität in Gießen in der Zeit von September 1966 bis Februar 1969 durchgeführt.

3.1. Test- und Wirtspflanzen

Alle für die Versuche verwendeten Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Als Kultursubstrat diente ein Gemisch von Komposterde mit Torf und Sand, welches mit Dampf oder mit Methylbromid sterilisiert wurde. Die Pflanzen wurden in Plastik-Töpfe eingetopft, durch regelmäßiges Räuchern oder Spritzen mit Insektiziden schädlingfrei gehalten, entsprechend den Anforderungen gedüngt und in einem jeweils für die Versuche geeigneten Zustand benutzt.

3.2. Testverfahren

Alle Test- und Wirtspflanzen wurden durch mechanische Inokulation mit virushaltigem Inokulum infiziert. Zur Infektion wurden die Blätter vorher mit Karborund (Partikelgröße 320 u) bestäubt, das Inokulum mit Glasspateln aufgenommen und vorsichtig eingegeben. Zur Infektion größerer Mengen von Pflanzen wurden an Stelle der Glasspatel Verbandmull-Kompressen in die Viruslösung eingetaucht und dann zur Inokulation benutzt. Sofort nach dem Abreiben wurden die so behandelten Blätter unter fließendem Wasser abgespült.

3.3. Virus-Isolate

Die untersuchten Virus-Isolate und ihre Herkunft sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Die untersuchten Virus-Isolate und ihre Herkunft

Virus-Isolat	Herkunft	Wirtspflanze	Autoren	zur Verfügung gestellt von
GMV-Y	U.S.A.	Spinat	Kuntz und Walker (1947)	Dr. Menke, Gießen, ex Walker, Madison
GMV-Q	Australien	Capsicum sp.	Francki (1964)	Dr. Francki, Adelaide, Australien
GMV-W 14	U.S.A.	Phaseolus vulgaris L.	Whipple und Walker (1941)	Dr. Sänger, Gießen, ex Grogan, Davis/Calif. U.S.A.
GMV-XD	Deutschland	Ölkürbis	Forghani et al. (1966)	Dr. Sänger, Gießen
GT	West-Türkei	Gurke	-	eigenes Isolat
PT	West-Türkei	Paprika	-	eigenes Isolat

3.4. Charakterisierung der Virus-Isolate auf Testpflanzen

Die Testpflanzen wurden in der schon angegebenen Weise im Gewächshaus angezogen und im geeigneten Entwicklungszustand inokuliert. Anschließend wurden die Primär- und die Sekundärsymptome beobachtet und verglichen.

Als Testpflanzen dienten : Nicotiana tabacum L. Sorten "Samsun" und "Xanthi-nc", Nicotiana glutinosa L., Chenopodium amaranticolor (Coste et Reyn.), Chenopodium quinoa Willd., Vigna sinensis Endl., Cucumis sativus L., Capsicum annuum L., Lycopersicon esculentum Mill.

3.5. Virusvermehrung

Als Ausgangsmaterial wurden eingefrorene oder gefriergetrocknete Blätter verwendet. Zur Virusvermehrung sind systemisch erkrankende Wirte besonders gut geeignet. Daher wurde für die Vermehrung Nicotiana tabacum L. Sorte "Xanthi-nc" benutzt. Da das Tabakmosaikvirus diese Art nur lokal zu infizieren vermag, konnte damit gleichzeitig eine stets mögliche Verunreinigung mit TMV ausgeschaltet werden. Im Sommer wurden kleinere Pflanzen im Sechs-Blatt-Stadium und im Winter größere Pflanzen im Zwölf-Blatt-Stadium zur Vermehrung verwendet. Das Inokulum wurde durch Homogenisation von systemisch erkrankten Blättern in 1 %iger K_2HPO_4 -Lösung hergestellt und ohne weitere Vorbehandlung direkt zur Infektion benutzt. Die infizierten Pflanzen wurden bei 22 bis 24 °C aufgestellt und bei intensiver Sonneneinstrahlung schattiert. Im Winter erhielten sie Zusatzlicht unter Langtagbedingungen.

Etwa 2 Wochen nach der Infektion wurden sowohl die primär infizierten als auch die systemisch erkrankten, jüngeren Blätter geerntet und über Nacht bei 4 °C

aufbewahrt. Nachdem die Blattstiele und Mittelrippen entfernt worden waren, wurden die Blattflächen als Ausgangsmaterial zur Virusreinigung benutzt.

3.6. Bestimmung der physikalischen Eigenschaften

Zur Charakterisierung von Pflanzen-Viren ist es vor allem wichtig, auch die physikalischen Eigenschaften zu bestimmen.

3.6.1. Verdünnungsendpunkt

Als Ausgangsmaterial wurden Tabakblätter 14 Tage nach der Infektion verwendet. Sie wurden zusammen mit der gleichen Menge 0,005 M Boratpuffer pH 9,0 homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch Mull filtriert. Davon ausgehend wurde eine 10-faktorielle Verdünnungsreihe mit demselben Puffer bis 1 : 1.000 000 hergestellt, wobei die einzelnen Verdünnungsstufen im Infektionstest getestet wurden.

3.6.2. Thermale Inaktivierung

Die Inaktivierungstemperatur wurde ebenfalls mit virushaltigem Pflanzenrohsaft festgestellt. Der Rohsaft wurde in derselben Weise wie für die Bestimmung des Verdünnungsendpunktes gewonnen. Für die einzelnen Temperaturstufen wurden je 10 ml des Inokulums für die Dauer von 10 Minuten in einem Reagenzglas in ein Wasserbad mit der entsprechenden Temperatur getaucht. Die Zeitmessung erfolgte, nachdem das Inokulum im Reagenzröhrchen die gewünschte Temperatur erreicht hatte. Nach der Wärmebehandlung wurden die Proben sofort im Eisbad abgekühlt. Der so behandelte Rohsaft wurde anschließend zum Infektionstest benutzt.

3.6.3. Bestimmung der Beständigkeit in vitro

Die Beständigkeit in vitro wurde nur für kurze Aufbewahrungszeiten bestimmt. Dazu wurden 2 g Blattmaterial mit 5 ml 1 % K_2HPO_4 -Lösung gemörsert und zur Infektion benutzt. Die andere Hälfte wurde bei $-23^{\circ}C$ eingefroren, 2 Tage später genauso behandelt und auf Pflanzen abgerieben. In einer zweiten Versuchreihe wurde das gleiche Verfahren mit gereinigtem Virus durchgeführt.

3.7. Virusreinigung

Zur Reinigung des GMV wurde eine Reihe von Methoden angewendet, die bereits in der Literatur als für GMV geeignet beschrieben worden sind (TOMLINSON et al. 1959; SCOTT, 1963; GROGAN et al. 1963). Alle drei Methoden wurden auf ihre Brauchbarkeit getestet. Da sich aber lediglich die Methode von SCOTT als geeignet erwiesen hat, soll nur sie im folgenden genauer beschrieben werden. Die anderen beiden Methoden sind im Anschluß daran in Form eines Fließdiagramms dargestellt. Die Methode von TOMLINSON et al. (1959) unterscheidet sich u.a. von der von SCOTT dadurch, daß zur Denaturierung der Pflanzenproteine nicht Chloroform, sondern Butanol verwendet wird. GROGAN et al. (1963) hingegen benutzen für diesen Zweck eine kurzzeitige Einstellung des pH-Wertes auf pH 4,6, wodurch die Pflanzenproteine ausfallen.

3.7.1. Reinigungsmethode nach SCOTT (1963)

Die Reinigungsmethode nach SCOTT ist im Diagramm 1 dargestellt und durch drei Merkmale charakterisiert. Zuerst wird das GMV aus frisch infizierten Tabakblättern mit einem Puffer hoher Salzkonzentration (0,5 M Zitratpuffer pH 6,5) extrahiert. Dabei werden die pflanzeigenen Proteine durch Chloroform-Zusatz denaturiert. Das geklärte Homogenisat wird wieder

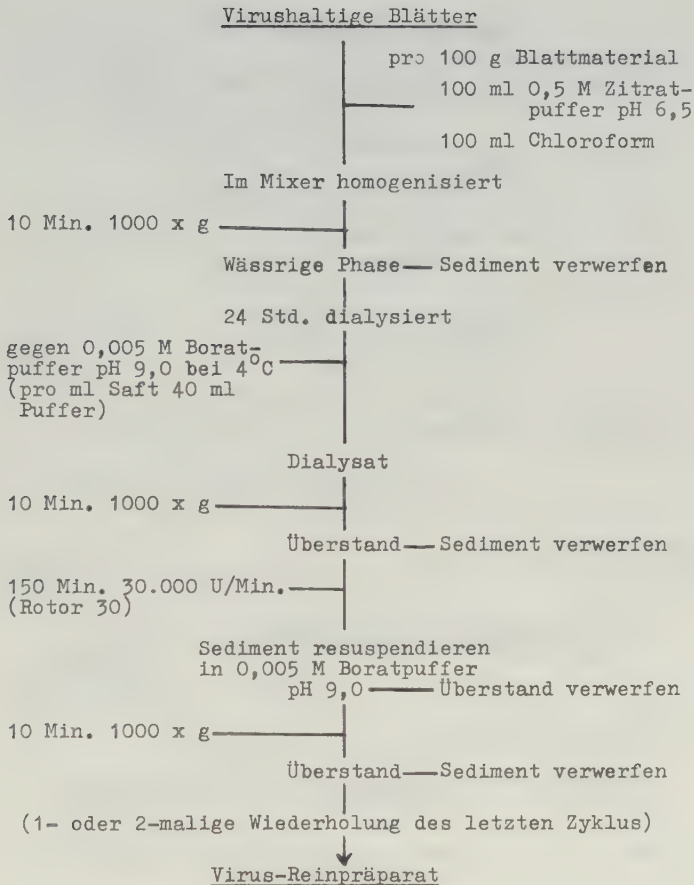


Diagramm 1: Reinigungsmethode für das Gurkenmosaikvirus nach SCOTT (1963)

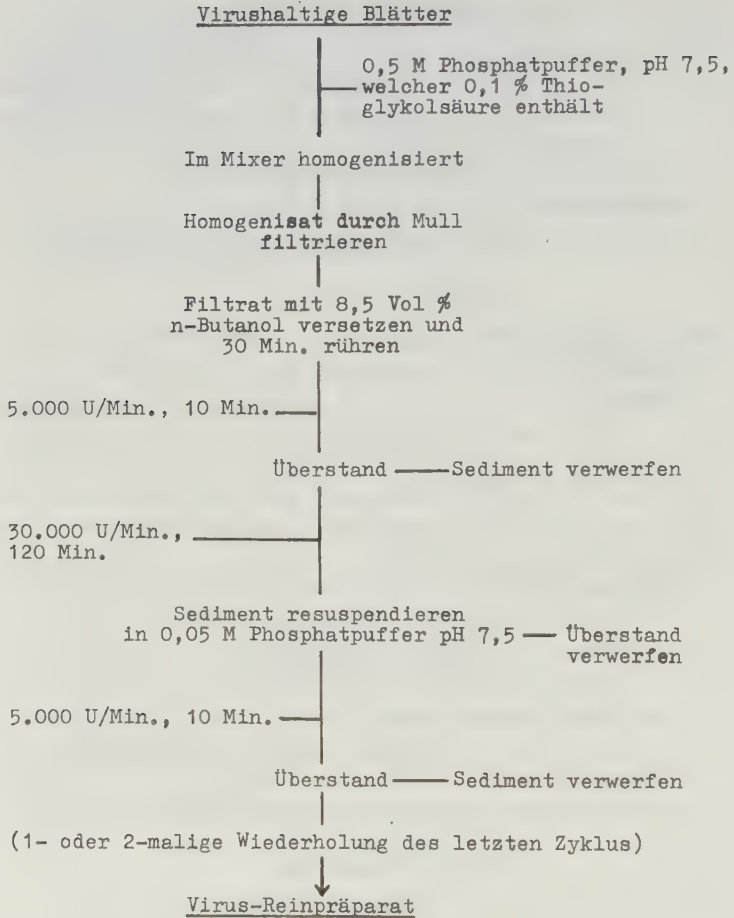
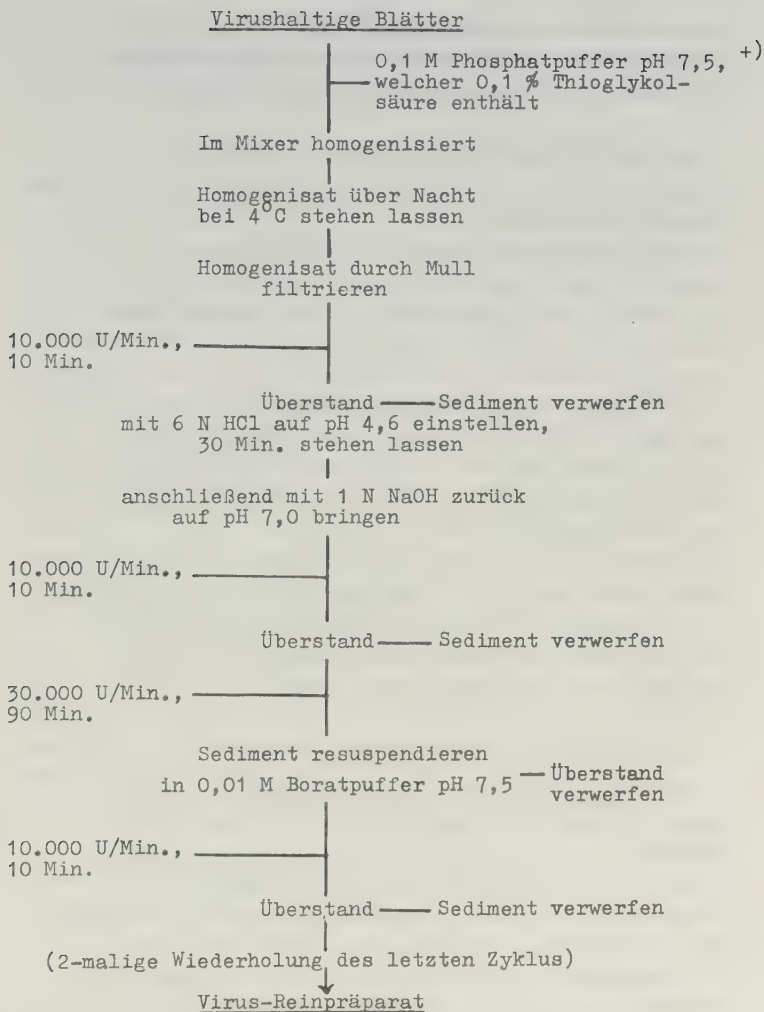


Diagramm 2: Reinigungsmethode für das Gurkenmosaik-
virus nach TOMLINSON et al. (1959)



+) Wegen der Puffermolarität leicht verändert

Diagramm 3: Reinigungsmethode für das Gurkenmosaik-
virus nach GROGAN et al. (1963)

gegen niedrig molaren Boratpuffer (0,005 M pH 9,0) dialysiert, der sich für GMV als infektiösitätserhaltendes und stabilisierendes Medium erwiesen hat.

3.7.2. Differential-Ultrazentrifugation

Zur Differential-Ultrazentrifugation wurden drei Zentrifugen benutzt.

1) Die Zentrifuge Junior II KS der Fa. Christ wurde einmal mit dem Schwenkbecherrotor bei etwa 2000 x g und 3000 Upm und zum anderen mit dem Winkelbecherrotor bei etwa 5 500 x g und 6000 Upm bei 0 °C gefahren.

2) Die Beckman Spinco-Ultrazentrifuge Modell L mit dem Rotor 21 (etwa 45 000 x g und 20 000 Upm), dem Rotor 30 (etwa 79 000 x g und 30 000 Upm) und dem Rotor 40 (etwa 105 000 x g und 40 000 Upm) wurde bei 4 °C gefahren.

3) Die Zentrifuge Universal Junior 15 000 der Fa. Christ wurde mit etwa 10 000 Upm (etwa 7 000 x g) bei 4 °C eingesetzt. Die Differential-Ultrazentrifugation wurde mit abwechselnd niedrig- und hochtourigen Zentrifugationen durchgeführt.

3.8. Dichtegradienten-Zentrifugation

Durch Zentrifugation des gereinigten Virus in einem Saccharose-Dichtegradienten kann man Viren einerseits in einer besonders reinen Form darstellen und andererseits die Reinheit und Homogenität der Präparate prüfen. Die Viruspartikel wandern während der Zentrifugation je nach ihrer Größe, Form und Dichte unterschiedlich schnell in einen Saccharose-Gradienten von zunehmender Dichte und Viskosität ein. Alle Teilchen mit den gleichen Eigenschaften sedimentieren dementsprechend gemeinsam als Bande, die nach der Zentrifugation bei genügend hoher Tarenzahl in durchfallendem Licht mit bloßem Auge sichtbar ist

und die dann durch geeignete Fraktionierung isoliert werden kann. Dieses Zentrifugations-Verfahren wurde von BRAKKE (1951, 1955, 1958, 1960) eingeführt.

Die Saccharose-Dichtegradienten wurden folgendermaßen hergestellt: Jeweils 7 ml einer 40, 30, 20 und 10 %igen Saccharoselösung in 0,1 M Tris-Puffer pH 8,0 wurden in Zentrifugenröhrchen übereinandergeschichtet. Um eine Vermischung der Lösungen an den Grenzflächen möglichst zu verhindern, wurden sie mit einer Pipette auf eine Schaumstoffscheibe gegeben, die auf der Gradientenoberfläche schwamm. Die auf diese Weise hergestellten Gradienten wurden dann mindestens 15 Stunden bei 4 °C aufbewahrt, um aus den stufenförmigen Gradienten durch Diffusion an den Grenzflächen annähernd kontinuierliche Gradienten zu erhalten. Dann wurden 0,5 bis 1,0 ml der konzentrierten Viruslösung (meist ca. 4 bis 6 mg Virus) auf die Oberfläche des Gradienten gegeben und anschließend 240 Min. bei 25 000 Umdrehungen pro Minute im Schwenkbecherrotor SW 25.1 zentrifugiert. Nach dem Lauf wurde das Röhrchen im Boden punktiert und der Inhalt in Fraktionen von 0,7 ml aufgeteilt. Nach entsprechender Verdünnung wurden die einzelnen Fraktionen im Spektralphotometer gemessen und anschließend auf ihre Infektiosität und ihre serologische Aktivität getestet.

3.9. Spektralphotometrische Messungen

3.9.1. U.V.-Absorptionsspektrum

Das U.V.-Absorptionsspektrum des GMV wurde mit Hilfe des Beckman-Spektralphotometers Modell DB gemessen. Die Messungen erfolgten im Bereich von 220 bis 320 nm, wobei stets hochgereinigte Viruslösungen verwendet wurden.

3.9.2. Feststellung der Virusaussbeute

In der vorliegenden Arbeit wurde die Virus-Konzentration bzw. -Ausbeute nur mit Viruslösungen ermittelt, die wenigstens dreimal hochtourig zentrifugiert worden waren. Nach den Untersuchungen von FRANCKI et al. (1966) ergibt 1 mg GMV (Q-Stamm) pro ml 5,0 optische Dichte-Einheiten bei 260 nm. Auf Grund dieser Beziehung ist es möglich, die Konzentration der GMV-Lösungen spektralphotometrisch zu bestimmen.

3.10. Serologische Untersuchungen

3.10.1. Herstellung des Antiserums

Konzentrierte Viruslösungen wurden nach der unter 3.7.1. angegebenen Reinigungsmethode hergestellt und in Portionen von 2 ml eingefroren. Zur Immunisierung wurde das Antigen aufgetaut und einem Kaninchen innerhalb von 14 Tagen dreimal intravenös injiziert. Um den Antiserum-Titer möglichst zu erhöhen, wurde das Antigen zusätzlich mit Algivant-Adjuvans emulgiert und subcutan appliziert. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden pro Tier ca. 25 ml Blut aus der Randvene des Ohres entnommen, anschließend über Nacht bei 4 °C stehengelassen und dann zur Klärung des Serums niedrigtourig zentrifugiert. Im Verlauf der Untersuchungen wurden mehrere Auffrischungsimpfungen (booster dose) mit Algivant-Adjuvans durchgeführt. Den Antiseren wurde zur Haltbarmachung Cialit (Hoechst) im Verhältnis 1 : 5.000 zugesetzt, so daß sie bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten.

3.10.2. Geldiffusionstest

Die serologischen Tests wurden als Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY (1949) durchgeführt. Dafür wurden Plastik-Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm benutzt. Die Agarschicht wurde aus 1 % Bacto-Agar "Difco" hergestellt, welcher in 0,01 M

Tris-Puffer pH 8,0 gelöst wurde und 0,9 % NaCl sowie Cialit (1 : 5.000) enthielt. Pro Petrischale wurden 25 ml Agargel verwendet. Einen Tag nach der Herstellung wurden die Antigen- und Antiserum-Löcher ausgestanzt und die Agarstückchen mit einer feinen Spatelspitze herausgehoben. Anschließend wurden Antigen und Antiserum randvoll in die Löcher einpipettiert. Zur Verhinderung der Austrocknung wurden dann die Agarplatten sofort mit Paraffinöl überschichtet und bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach 1 bis 3 Tagen waren die Präzipitationslinien meist deutlich sichtbar, so daß sie bonitiert werden konnten. Die Intensität und Dichte der Linien nahm im Laufe der Zeit meist noch geringfügig zu.

3.10.3. Kreuzabsorptionsteste zur Feststellung der Verwandtschaftsverhältnisse

Da die verschiedenen Isolate im Agar-Geldiffusions-test alle miteinander reagierten, wurde eine weitere Differenzierung durch Kreuzabsorption versucht. Diese Kreuzabsorptionsteste wurden nach der Intra-Gel-Methode von VAN REGENMORTEL (1967) durchgeführt. Dafür wurde das Antigen zuerst in das zentrale Loch eingefüllt. Nach 24 Stunden wurde in das gleiche Loch das heterologe Antiserum gegeben, welches zur Absorption benutzt werden sollte. Anschließend wurden in die peripheren Löcher die zu prüfenden Antigene eingefüllt und die Agarplatten sofort mit Paraffinöl überschichtet.

3.11. Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Viruspartikel wurden Suspensionen hochgereinigter Präparate zuerst über Nacht gegen eine 1 %ige Ammoniumcarbonat-Lösung (pH 8,8) dialysiert, um das Virus in einem Puffer-Medium vorliegen zu haben, welches

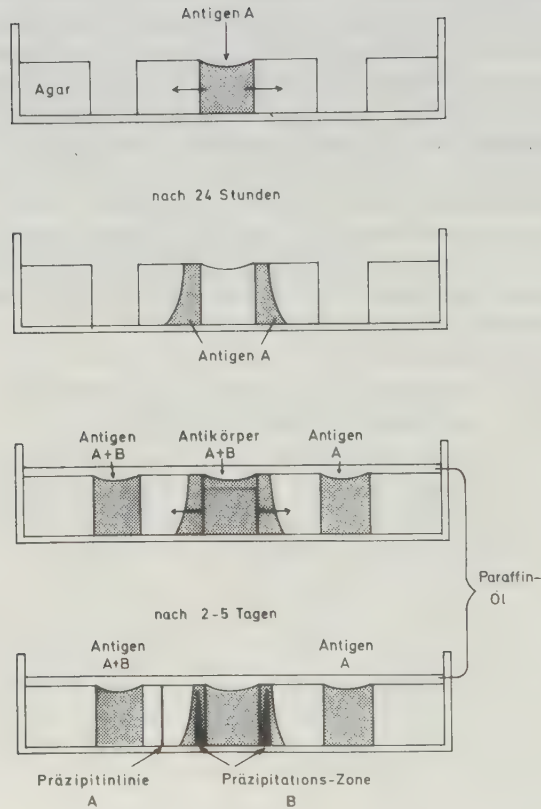


Abbildung 1: Diagrammatische Darstellung der Intra-Gel-Methode für Kreuzabsorptionsteste (modifiziert nach VAN REGENMORTEL, 1967).

keine Rückstände hinterläßt. Die Suspensionen wurden mit einem "Vaponefrin-Nebulizer" auf "Parlodion" (Dinitrocellulose)-beschichtete Objektträgernetze aufgesprüht. Vor dem Aufsprühen wurden den Virusproben ca. 1/4 ihres Volumens 0,1 %ige wässrige Serum-Albumin-Lösung zugesetzt. Dieser Zusatz garantiert eine gute Spreitung der auf die Trägerfolie aufgesprühten Mikrotropfen und sorgt weiterhin für die Haftung und damit gleichmäßige Verteilung der Viruspartikel auf der Folie während der Verdampfung des Suspensionsmediums. Außerdem wurde jeweils ein Tropfen einer Polystyrol-Latex-Suspension (Dow Chemical) zugemischt, deren elektronendichte sphärische Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 565 nm das Auffinden der Mikrotropfen erleichtern und die gleichzeitig als Meßstandard benutzt werden können. Zur Kontrastierung wurden die Präparate im Hochvakuum mit Platin-Iridium unter einem Winkel von 40° schrägbedampft. Die Untersuchung erfolgte im elektrostatischen Elektronenmikroskop EM 9a der Fa. Zeiss. Die photographischen Aufnahmen wurden bei 8.000- und 26.000-facher Vergrößerung auf Agfa-Scientia-Planfilm (23D56) aufgenommen. Diese Negative wurden dann in üblicher Weise zur Herstellung der Aufnahmen verwendet.

4. ERGEBNISSE DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN

4.1. Testpflanzensystem

Der Vergleich der verschiedenen Virus-Isolate auf geeigneten Testpflanzen ermöglicht auf Grund spezifischer Reaktionen bereits eine grobe Charakterisierung und Bestimmung der Zugehörigkeit dieser Viren. Weiterhin eignen sich Testpflanzen, welche mit Lokalläsionen reagieren, vor allem für quantitative Untersuchungen, wie sie z.B. für die Bestimmung der Virusausbeute nötig sind.

4.1.1. Testpflanzen, die mit Lokalläsionen reagieren

Vigna sinensis L.: Die Reaktionen, welche die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate hervorrufen, sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Dabei zeigt sich, daß von den 6 untersuchten Isolaten 4 Isolate die für das GMV typischen punktförmigen Nekrosen und keine systemische Erkrankung hervorrufen. Damit weist auch das türkische Isolat von Gurke eindeutig GMV-Eigenschaften auf. Das türkische Isolat von Paprika hingegen verhält sich ähnlich wie das GMV-Isolat W 14 und erzeugt Chlorosen auf den Primärblättern und zusätzlich eine systemische Infektion im Neuzuwachs.

Chenopodium quinoa L. und Chenopodium amaranticolor L.

Die Reaktionen der 4 GMV-Isolate und der zwei weiteren Virus-Isolate auf beiden Chenopodium-Arten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Alle untersuchten Isolate einschließlich der beiden türkischen Herkünfte rufen charakteristische Läsionen auf den inokulierten Blättern hervor, ohne daß die Pflanzen anschließend systemisch erkranken. Es konnten keine auffälligen Unterschiede zwischen den Symptomen entdeckt werden, die von den verschiedenen Isolaten hervorgerufen wurden.

Tabelle 2: Reaktion von Vigna sinensis L. auf die
Infektion mit verschiedenen Virus-Isolaten

Virus-Isolat	Ausbildung der Lokalläsionen	Systemische Infektion
GMV-Y	punktförmige, bräunliche Nekrosen	keine
GMV-Q	" "	"
GMV-KD	" "	"
GT	" "	"
GMV-W 14	chlorotische Flecke	Mosaiksymptome und Blattdeformationen
PT	punktförmige Chlorosen	" "

Tabelle 3: Reaktion von Chenopodium amaranticolor und Chenopodium quinoa auf die Infektion mit verschiedenen Virus-Isolaten.

<u>Chenopodium amaranticolor L.</u>		<u>Chenopodium quinoa L.</u>	
Ausbildung der Systemische Virus-Isolat Lokalläsionen Erkrankung		Ausbildung der Systemische Lokalläsionen Erkrankung	
GMV-Y	Nekrosen mit keine hellbraunem Hof, Ø max. 1mm	Nekrosen mit keine chlorotischer Randzone, Ø max. 2-3 mm	keine
GMV-Q	" "	" "	"
GMV-KD	" "	" "	"
GT	" "	" "	"
GMV-W 14	" "	" "	"
PT	" "	" "	"

4.1.2. Testpflanzen, die systemisch reagieren

Die Reaktionen der GMV-Isolate auf den wichtigsten Testpflanzen, die systemisch infiziert werden, sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Ergebnisse werden im folgenden für die einzelnen Arten getrennt besprochen.

Nicotiana tabacum L. Sorte "Xanthi-nc": Bei dieser Tabakart zeigen die abgeriebenen Blätter nur gelegentlich im Herbst und im Frühjahr Primärsymptome, die manchmal von zarten Nekrosen umgrenzt sind. Als erstes Anzeichen einer Infektion ist eine diffuse Adernaufhellung an den jüngsten Blättern sichtbar, die sich etwa im Verlauf der dritten Woche zu einer Adernbänderung ausbildet. An den sich neu entfaltenden Blättern tritt eine mehr oder weniger feinfleckige, diffuse Mosaikscheckung auf und gelegentlich kommen Blattdeformationen in Form von Verschmälerungen, Verkürzungen und manchmal von Verbreiterungen vor. Es bestehen nur geringfügige Unterschiede in den Symptomen, die von den verschiedenen Isolaten hervorgerufen werden. Lediglich das Isolat PT weicht etwas von den übrigen Isolaten ab, weil es anfangs ein weniger ausgeprägtes Mosaik verursacht.

Nicotiana tabacum L. Sorte "Samsun": Die Symptombilder auf Samsun-Tabak entsprechen in allen wesentlichen Punkten denen auf Xanthi-Tabak.

Nicotiana glutinosa L.: Nur gelegentlich und offenbar in Abhängigkeit von der Jahreszeit treten auf den abgeriebenen Blättern etwa 4 bis 5 Tage nach der Inokulation fahle, gelbgrüne, rundliche und manchmal konzentrisch gezeichnete Flecken auf. 6 bis 8 Tage nach der Inokulation zeigen die jüngsten Blätter Adernaufhellung und Gelbfärbung. Einige Tage später

Tabelle 4: Reaktion systemisch erkrankender Testpflanzen auf die Infektion mit verschiedenen Virus-Isolaten

	Nicotiana tabacum L.	Nicotiana tabacum L.	Nicotiana glutinosa L.	Capsicum annuum L.	Lycopersicon esculentum Mill.	Cucumis sativus L.
Virus-Isolat	"Xanthi-nc."	Sorte	"Samsun"			
GMV-Y	Mosaik und Blattdeformationen	Mosaik und Blattdeformationen	Mosaik, Ver- gilbung und Blattdeformationen	Mosaik, Blattde- formationen, Ro- setten- wuchs	Mosaik, Blattdefor- mationen, "Farnblatt- rigkeit"	chloroti- sche Flecke und Mosaik- symptome
GMV-Q	"	"	"	"	"	"
GMV-W 14	"	"	"	"	"	"
GMV-XD	"	"	"	"	"	"
GT	"	"	"	"	"	"
PT	"	"	Mosaik und Blattdefor- mationen aber keine Vergilbung	"	"	keine Symptome

weisen sie eine chlorotische Scheckung und im Frühjahr und im Herbst manchmal strichförmige Nekrosen auf. Die Pflanzen bleiben meist im Wachstum stark zurück und die sich neu entwickelnden Blätter zeigen die verschiedensten Formveränderungen wie Verkleinerungen, Verkrümmungen und blasige Aufbeulungen.

Capsicum annuum L.: Die jeweils mit einem der sechs Isolate infizierten Blätter zeigen keinerlei Primärsymptome. Etwa zwei Wochen nach der Inokulation kann man an den jungen, neu zuwachsenden Blättern eine leichte Vergilbung beobachten. Gleichzeitig rollen sich die Blattspreiten kahnförmig nach oben ein, um sich nach einigen Tagen wieder auszubreiten. Bei den voll entwickelten Blättern verfärben sich die Interkostalfelder gelb. Später zeigen die Pflanzen das typische Symptombild der sogenannten "Reisigkrankheit". Die neu gebildeten Blätter sind verschmälert, mißgebildet und chlorotisch. Die Pflanzen nehmen schließlich ein rosettenartiges Aussehen an, wie es nach KOVACHEVSKY (1942) für die Reisigkrankheit charakteristisch ist.

Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den von den verschiedenen Isolaten induzierten Symptomen beobachtet werden.

Lycopersicon esculentum Mill.: Auch an der Tomate ist keine Differenzierung der 6 Virus-Isolate möglich. Auf den infizierten Blättern erzeugen sie keinerlei Symptome. Erst 10 bis 12 Tage nach der Inokulation tritt an den jüngsten Blättern eine hell-dunkelgrüne Scheckung auf, die im Laufe der Zeit immer deutlicher wird, wobei sich die zuerst hellgrünen Partien chlorotisch verfärben. In späteren Stadien der Erkrankung

bilden sich Blattdeformationen und starke Verzweigungen aus. Dieses Symptombild ist weiterhin durch dünne Triebe und fadenförmige Blätter charakterisiert und hat zu dem Namen "Farnblättrigkeit der Tomate" geführt.

Cucumis sativus L.: Auch auf der Gurke ist es nicht möglich, 5 der 6 untersuchten Isolate voneinander zu unterscheiden. Eine Ausnahme macht lediglich das Isolat PT, denn es ist weder mechanisch noch mit Blattläusen auf Gurke übertragbar. Alle Versuche, das Virus nach der Inokulation auf Gurke von Gurke zurück auf Tabak oder Cowpea zu übertragen, mißlingen. Das bedeutet gleichzeitig, daß auch eine inapparente Infektion der Gurke ausgeschlossen werden kann.

4.2. Physikalische Eigenschaften

4.2.1. Verdünnungsendpunkt

Die Resultate der Versuche zur Bestimmung des Verdünnungsendpunktes sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. In dieser Serie wurden allerdings nur die beiden türkischen Isolate mit dem Typ-Stamm Y des GMV verglichen. Es zeigt sich dabei, daß der Verdünnungsendpunkt bei allen drei Isolaten bei 1 : 1.000 000 und somit an der Grenze der in der Literatur angegebenen Werte liegt.

4.2.2. Thermale Inaktivierung

Die Ergebnisse der Temperatur-Inaktivierungsversuche sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Inaktivierungstemperatur für die Isolate Y und PT liegt zwischen 70 und 75 °C und für das Isolat GT wurden Werte zwischen 75 und 80 °C ermittelt. Diese Temperaturen liegen im oberen Bereich der Werte, die von verschiedenen Autoren angegeben worden sind. Die bisher publizierten Werte für die verschiedenen

Tabelle 5: Bestimmung des Verdünnungsendpunktes der Isolate GT und PT im Vergleich mit dem GMV-Y. Die Verdünnungsstufen wurden auf Xanthi-Tabak getestet

Verdünnung	Infektiosität a)					
	Isolat GT	Isolat PT		GMV-Y		
	K/G	%	K/G+	%	K/G	%
1:10	5/5	100	5/5	100	5/5	100
1:100	5/5	100	5/5	100	5/5	100
1:1000	10/10	100	10/10	100	10/10	100
1:10.000	10/10	100	10/10	100	10/10	100
1:100.000	9/10	90	5/10	50	10/10	100
1:1000.000	8/10	80	3/10	30	4/10	40

a) K/G = Zahl der systemisch erkrankten Pflanzen
Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen
 % = %-Satz der systemisch erkrankten Pflanzen

Tabelle 6: Thermale Inaktivierung der Virus-Isolate GT und PT und des GMV-Y. Die einzelnen Temperaturstufen wurden auf Xanthi-Tabak getestet

Temperatur in °C	Infektiosität a)					
	Isolat GT		Isolat PT		GMV-Y	
	K/G	%	K/G	%	K/G	%
50	10/10	100	10/10	100	10/10	100
60	10/10	100	10/10	100	10/10	100
65	8/10	80	5/10	50	10/10	100
70	5/10	50	5/10	50	5/10	50
75	2/10	20	0/10	0	0/10	0
80	0/10	0	0/10	0	0/10	0

Zahl der systemisch erkrankten Pflanzen

a) K/G =

Gesamtzahl der inokulierten Pflanzen

% = %-Satz der systemisch erkrankten Pflanzen

Isolate schwanken allerdings zwischen 60 und 80 °C, was sich sowohl auf methodische Unterschiede in den Testverfahren als auch auf die Verschiedenheit des Virusmaterials zurückführen läßt.

4.2.3. Beständigkeit in vitro

Die bisher publizierten Werte für die Beständigkeit in vitro sind sehr unterschiedlich, was ebenfalls sehr wahrscheinlich mit den stark voneinander abweichenden Versuchsbedingungen zusammenhängt.

Im Rahmen dieser Arbeit waren lediglich zwei Fragen von Interesse:

- 1) Es galt nachzuprüfen, ob das virushaltige Blattmaterial direkt nach der Ernte und in frischem Zustand verwendet werden muß oder ob es möglich ist, die Blätter eingefroren zu lagern und bei Bedarf aufzutauen und dann zur Virus-Isolation zu verwenden.
- 2) Es sollte weiterhin festgestellt werden, ob das gereinigte Virusmaterial sofort zur Immunisierung verwendet werden muß oder über längere Zeit im Kühlschrank oder im tiefgefrorenen Zustand gelagert werden kann.

Die Ergebnisse entsprechender Versuche sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Man kann daraus entnehmen, daß es nicht empfehlenswert ist, zur Virus-Isolation von Blattmaterial auszugehen, welches in tiefgefrorenem Zustand gelagert wurde. Der Infektiositätsverlust, der durch das Einfrieren und Auftauen der Blätter eintritt, dürfte in den meisten Fällen weit über 80 % betragen. Demgegenüber ist es ohne weiteres möglich, das hochgereinigte Virus in tiefgefrorenem Zustand aufzubewahren, ohne daß ein wesentlicher Verlust seiner Infektiosität zu befürchten ist.

Tabelle 7: Beständigkeit der Virus-Isolate GT und PT und des GMV-Y in vitro

	Infektiosität a)			
	Blattmaterial b)		gereinigtes Virus c)	
Virus-Isolat	homogenisiert und sofort inokuliert	eingefroren, nach 2 Tagen homogenisiert und inokuliert	inokuliert unmittelbar inokuliert	inokuliert nach Einfrieren und Auftauen
GT	ca. 1 000	150	234	233
PT d)	237	149	456 e)	369
GMV-Y	ca. 1 000	300	249	215

a) Zahl der Läsionen pro Blatt ermittelt aus 20 infizierten Blättern von Vigna sinensis L.

b) 2 g Tabakblätter werden in 5 ml 1% K_2HPO_4 homogenisiert.

c) Nach der 2. hochtourigen Zentrifugation resuspendiert und in einer Verdünnung eingefroren und zur Inokulation benutzt, bei der ca. 200 - 300 Läsionen auftreten.

d) Zahl der Läsionen pro Blatt ermittelt aus 15 Blättern von Chenopodium amaranticolor.

e) Verdünnung 1 : 50.

4.3. Virusreinigung

Zur Feststellung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Virus-Isolaten sind spezifische Antiseren nötig. Das bedeutet, daß möglichst reines Antigen zur Immunisierung der Kaninchen benutzt werden sollte. Aus diesem Grund wurde zuerst versucht, die für die zu untersuchenden Stämme geeignetste Reinigungsmethode zu finden.

4.3.1. Vergleich verschiedener Reinigungsmethoden

Die Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen zur Auffindung geeigneter Methoden sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Es zeigt sich dabei, daß für die drei Isolate GMV-Y, GT und PT die Reinigungsmethode nach SCOTT die jeweils größte Virusausbeute liefert. Weiterhin konnte beobachtet werden, daß die Virusausbeute bei den verschiedenen Isolaten sehr unterschiedlich ist. Die geringste Ausbeute liefert das Isolat PT mit durchschnittlich etwa 10 mg Virus pro 100 g Blatt, während die höchsten Viruskonzentrationen mit maximal 30 mg Virus pro 100 g Blatt beim Isolat Y auftraten. Die übrigen 4 Isolate erreichen Konzentrationen, die zwischen diesen beiden Werten liegen.

Da das Isolat PT im Vergleich zu den anderen Isolaten einige abweichende Eigenschaften zeigt und weil bei ihm mit den übrigen Methoden keine befriedigenden Resultate erhalten werden konnten, wurde in diesem Fall zusätzlich die Reinigungsmethode für das Squash mosaic virus nach CAMPBELL (1964) geprüft. Dabei ergab sich, daß auch diese Methode keinerlei Vorteil gegenüber der Methode von SCOTT bietet, so daß letztere als die geeignetste Methode in allen weiteren Versuchen verwendet wurde.

Tabelle 8: Vergleich verschiedener Methoden zur Reinigung des GMV-Y und der Virus-Isolate GT und PT a)

Virus-Isolat	Infektiosität des Antigens b)		
	gewonnen nach der Reinigungsmethode von		
	TOMLINSON et al. (1959)	GROGAN et al. (1963)	SCOTT (1963)
GMV-Y	15	90	ca. 1 000
GT	0	0	244
PT c)	46	148	264

a) Pro Versuchsglied wurden jeweils 50 g Tabakblätter (2 Wochen p.i.) und 100 ml der entsprechenden Puffer verwendet. Die zur Infektion benutzten Lösungen wurden jeweils 1:10 verdünnt.

b) Zahl der Lokalläsionen pro Blatt ermittelt aus 8 Blättern von Vigna sinensis.

c) Zahl der Lokalläsionen pro Blatt ermittelt aus 10 Blättern von Chenopodium amaranticolor.

4.3.2. Feststellung des geeignetsten Puffermediums für Isolat GT

Bei den verschiedenen Reinigungsverfahren werden verschiedene Puffermedien zur Resuspension der Sedimente benutzt. Nun hat sich aber im Fall des GMV-Isolates Y herausgestellt (SCOTT, 1963), daß 0,005 M Boratpuffer pH 9,0 das beste Resuspensionsmedium ist, welches allen anderen Pufferarten und -konzentrationen weitaus überlegen ist. Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich dann auch, daß die Resuspension des Isolates Y in 0,005 M Boratpuffer keinerlei Schwierigkeiten bereitet, während im gleichen Medium der größte Teil des Isolates GT ungelöst blieb und nicht resuspendiert werden konnte. Es erhob sich daher die Frage, ob durch entsprechende Veränderung der Puffermedien eine bessere Resuspension möglich ist. Diese optimale "Löslichkeit" ist für die Gewinnung von hochkonzentriertem Antigen und für eine maximale Ausbeute eine wesentliche Voraussetzung. Zur Klärung dieser Fragen wurden daher der pH-Wert und die Molarität des Puffers wie auch die Puffersorte selbst variiert und der Einfluß dieser Änderungen auf die Löslichkeit der Virussedimente getestet. Die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit dem Isolat GT sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Es zeigt sich dabei, daß Na-Azetat-Puffer und Tris-Puffer in einer Konzentration von 0,1 M und mit einem pH von 7,0 für die Resuspension des Isolates GT völlig ungeeignet sind. Der größte Teil des Virusmaterials geht nämlich schon bei der niedrigtourigen Zentrifugation ins Sediment, so daß der Überstand nur noch wenig infektiöses Virus enthält. 0,02 M Boratpuffer pH 7,6, Na-Zitratpuffer 0,01 M pH 6,3 und 0,01 M EDTA pH 7,0 eignen sich zwar besser, aber die Infektiositätswerte des Überstandes liegen immer noch bei etwa 50 bis 60 % der maximalen Werte. Die besten Ergebnisse liefern die restlichen vier Puffer, wobei die

Tabelle 9: Einfluß verschiedener Puffer auf die
"Löslichkeit" des türkischen Isolates GT

Puffer	Molari- tät	pH	Neigung zur a)	Infektiosität des Überstandes	
			Sediment- bildung	Zahl der Läsio- nen b)	%
Borat	0,005	9,0	+	73,5	100
Borat	0,02	7,6	+	46,3	63
Na-K- Phosphat	0,01	7,5	-	67,0	91,1
Na-Zitrat	0,01	6,3	-	38,7	52,5
Na-Azetat	0,1	6,0	++	4,9	6,6
Tris	0,1	7,0	+++	11,0	15,0
Phosphat- Borax	0,1	7,0	-	93,5	127,2
Tris- Phosphat	0,05	9,0	-	74,9	101,9
EDTA	0,01	7,0	-	43,7	59,4
Phosphat + EDTA c)	0,1	7,0	-	82,0	111,6

a) Auftreten eines Sedimentes nach niedrigtouriger
Zentrifugation (4 000 x g/30 Min.),

- = kein sichtbares Sediment

+, ++, +++ = relative Größe des Sedimentes

b) Zahl der Läsionen pro Blatt ermittelt aus 6 Blättern
von Vigna sinensis.

c) 0,001 M EDTA

Kombination Phosphat-Borax offenbar deshalb so besonders gute Werte ergibt, weil einerseits das Phosphat bekanntlich den Infektionserfolg über seine Wirkung auf das Blatt wesentlich erhöhen kann, während sich andererseits das Borat auf das Virus selbst sehr günstig auswirkt. Für alle weiteren Versuche wurde dann aber dennoch 0,005 M Boratpuffer pH 9,0 ausgewählt, weil sich dieser Puffer bereits bei den GMV-Vergleichsstämmen Y und Q als am besten geeignet erwiesen hatte (SCOTT, 1963; FRANCKI et al., 1966).

Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, daß ein einziger Puffer ohne wesentliche Nachteile für alle Isolate als Resuspensionsmedium verwendet werden konnte.

4.4. Bestimmung der spektralen Absorptionskurve

Für exakte serologische Versuche ist die Kenntnis der Virus-Antigen-Konzentration eine wichtige Vorbedingung. Wie eingangs bereits erwähnt, beträgt die Absorption von 1 mg GMV pro ml 5,0 optische Dichte-Einheiten bei 260 nm (FRANCKI et al., 1966). Auf Grund dieser Beziehung kann die Viruskonzentration von GMV-Lösungen auf einfache Weise spektralphotometrisch ermittelt werden. Allerdings müssen die entsprechenden Lösungen möglichst hochgereinigt und vor allem frei von jeglichen Pflanzenfarbstoffen sein, die unter Umständen ebenfalls bei 260 nm absorbieren und so das Ergebnis verfälschen würden.

Mit der Hilfe der spektralen Absorptionsmessung läßt sich aber nicht nur die Konzentration, sondern auch die "Reinheit" einer Viruslösung beurteilen. Nach FRANCKI et al. (1966) sollte das Verhältnis zwischen Absorptions-Maximum (260 nm) und -Minimum (bei ca. 240 nm) beim GMV möglichst ca. 1,09 - 1,39 betragen.

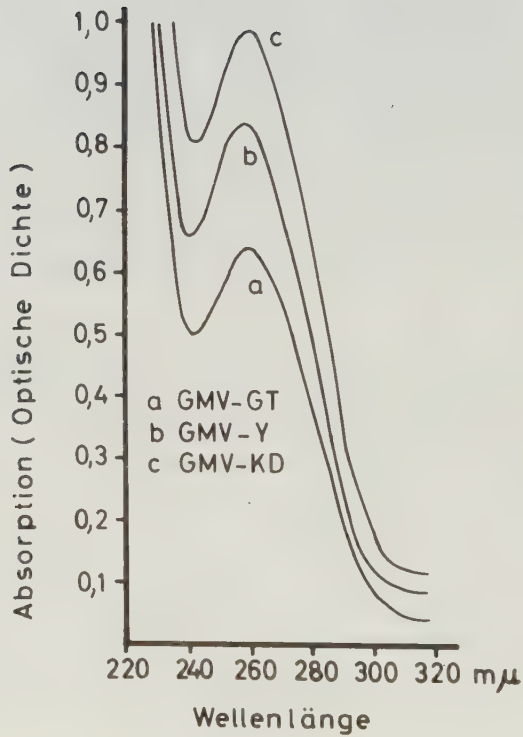


Abbildung 2: Kurven der UV-Absorption von Suspensionen verschiedener Isolate des GMV zwischen 220 und 320 nm

In Abbildung 2 sind die Absorptionskurven entsprechend verdünnter Lösungen der Isolate GT, KD und Y dargestellt. Wie man sieht, handelt es sich um charakteristische Kurven von hochgereinigten Viruslösungen, deren Reinheitsgrad den üblichen Forderungen weitgehend entspricht, da ihr Quotient $\frac{\text{Max.}}{\text{Min.}}$ durchschnittlich zwischen 1.23 und 1.29 liegt.

4.5. Virusausbeuten

Zur Erzielung einer möglichst hohen Virusausbeute sind eine ganze Reihe von verschiedenen Faktoren zu berücksichtigen. Sie hängt in erster Linie von der Kombination Virus-Isolat - Wirtspflanzenart ab. Weiterhin können die Jahreszeit und die Temperatur während der Virusvermehrung eine entscheidende Rolle spielen.

Wie aus den vorangehenden Abschnitten hervorgeht, ist schließlich die Reinigungsmethode zusammen mit den verwendeten Resuspensionsmedien ein weiterer bedeutsamer Faktor. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, daß der Einfluß der verschiedenen Parameter zur Erzielung einer maximalen Ausbeute im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert untersucht zu werden brauchte. Die Gewinnung konzentrierter Viruslösungen gelang bei allen Isolaten ohne besondere Schwierigkeiten. Je nach Virus-Isolat ließen sich aus 1 kg Blattmaterial ohne Mittelrippen zwischen 90 und 300 mg Virus isolieren. Die größten Virusmengen konnten beim Isolat Y erhalten werden.

4.6. Serologische Untersuchungen

Die in den vorangehenden Abschnitten diskutierten Ergebnisse lieferten die Voraussetzungen für die serologischen Untersuchungen, die das Hauptgewicht der

Arbeit bilden. Mit ihrer Hilfe sollten die serologischen Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den verschiedenen Virus-Isolaten geklärt werden.

4.6.1. Homologe Teste

Im ersten Teil der serologischen Untersuchungen wurden Teste mit homologen Systemen durchgeführt, die zur Feststellung der Titer sowohl der AS als auch der AG dienten. Auf ihnen aufbauend wurden dann die heterologen Testserien angesetzt.

Bei einem homologen serologischen Test wird ein bestimmtes Antiserum gegen das entsprechende (homologe) Virus getestet, welches vorher als Antigen zur Herstellung dieses speziellen Antiserums Kaninchen injiziert worden war. Mit Hilfe dieses Testes kann man sowohl die Qualität als auch die Spezifität der Antiseren feststellen. Alle Teste wurden als Agardiffusionstest nach OUCHTERLONY (1949) durchgeführt. Dabei wurde das Antiserum in 2-faktorielle Verdünnung und das Antigen in 7 Konzentrationsstufen von 4 mg bis 0,06 mg Virusantigen pro ml benutzt. Die auftretenden Präzipitationslinien wurden 3 Tage nach dem Einfüllen der Lösungen entsprechend ihrer Intensität bonitiert. Dabei wurde eine gleitende Wertskala benutzt, bei der der Wert 1 eine eben gerade noch sichtbare Linie anzeigt, während der Wert 5 einer sehr intensiven und breiten Präzipitationsbande entspricht.

Die Ergebnisse der mit den 6 Isolaten durchgeführten homologen Teste sind in den folgenden 6 Einzel-Tabellen (Nr. 10 - 15) dargestellt. Aus diesen Resultaten kann man zusammenfassend folgern, daß die Gewinnung hochtitriger GMV-Antiseren trotz vielfach wiederholter Immunisierung mit konzentrierten Antigen-Lösungen nicht möglich zu sein scheint. Der höchste Antiserum-Titer, der erreicht werden konnte, war

Tabelle 10: Reaktion des Antiserums Q mit seinem homologen Antigen GMV-Q a)

Antigen-Verdünnung in mg Virus/ml	Antiserum-Verdünnung b)									
	unverd.	2	4	8	16	32	64	128		
4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,68	4	4	4	2	0	2	2	1		
1,0	4	4	3	1	0	2	2	0		
0,5	5	4	4	3	2	3	2	0		
0,25	5	5	5	5	5	2	2	0		
0,125	4	4	4	4	4	2	2	1		
0,06	3	3	3	3	3	2	2	1		

a) Die Zahlen geben von 1-5 ansteigende Intensitätsgrade der Präzipitationslinien im Agar-Geldiffusionstest an;

0 = keine Reaktion; - = nicht getestet.

b) Reziproke Werte.

Tabelle 11: Reaktion des Antiserums Y mit seinem homologen Antigen GMV-Y a)

Antigen-Verdünnung in mg Virus/ml	Antiserum-Verdünnung b)									
	unverd.	2	4	8	16	32	64	128		
4,0	3	3	1	0	0	0	0	0		
2,0	4	4	2	0	0	0	0	0		
1,0	5	4	2	1	0	0	0	0		
0,5	5	4	3	2	2	2	0	0		
0,25	3	3	3	3	2	2	1	0		
0,125	2	2	2	2	2	2	1	0		
0,06	0	0	0	0	0	1	1	1		

a) Die Zahlen geben von 1 - 5 ansteigende Intensitätsgrade der Präzipitationslinien im Agar-Geldiffusionstest an;

0 = keine Reaktion; - = nicht getestet.

b) Reziproke Werte.

Tabelle 12: Reaktion des Antiserums W 14 mit seinem homologen Antigen GMV-W 14 a)

Antigen-Verdünnung in mg Virus/ml	Antiserum-Verdünnung b)							
	unverd.	2	4	8	16	32	64	128
3,25	2	2	2	2	2	2	0	0
2,0	2	2	2	2	2	2	0	0
1,0	1	1	1	0	0	0	0	0
0,5	1	0	0	0	0	0	0	0
0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
0,125	0	0	0	0	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Die Zahlen geben von 1 - 5 ansteigende Intensitätsgrade der Präzipitationslinien im Agar-Geldiffusionstest an;

0 = keine Reaktion; - = nicht getestet.

b) Reziproke Werte.

Tabelle 13: Reaktion des Antiserums KD mit seinem homologen Antigen GMV-KD a)

Antigen-Verdünnung in mg Virus/ml	Antiserum-Verdünnung b)									
	unverd.	2	4	8	16	32	64	128		
4,0	3	1	1	1	1	1	0	0		
2,0	3	3	2	1	1	1	0	0		
1,0	2	2	2	1	1	1	0	0		
0,5	3	3	3	2	2	2	0	0		
0,25	2	2	2	2	1	1	0	0		
0,125	2	2	1	1	1	1	0	0		
0,06	1	1	1	1	1	1	0	0		

a) Die Zahlen geben von 1 - 5 ansteigende Intensitätsgrade der Präzipitationslinien im Agar-Geldiffusionstest an;

0 = keine Reaktion; - = nicht getestet.

b) Reziproke Werte.

Tabelle 14: Reaktion des Antiserums GT mit seinem homologen Antigen GT a)

Antigen-Verdünnung in mg Virus/ml	Antiserum-Verdünnung b)									
	unverd.	2	4	8	16	32	64	128		
4,0	3	2	1	0	0	0	0	0		0
2,0	2	2	1	1	1	1	0	0		0
1,0	2	1	1	1	1	0	0	0		0
0,5	1	0	0	0	0	0	0	0		0
0,25	2	1	0	0	0	0	0	0		0
0,125	1	1	1	0	0	0	0	0		0
0,06	1	1	1	0	0	0	0	0		0

a) Die Zahlen geben von 1 - 5 ansteigende Intensitätsgrade der Präzipitationslinien im Agar-Geldiffusionstest an;

0 = keine Reaktion; - = nicht getestet.

b) Reziproke Werte.

Tabelle 15: Reaktion des Antiserums PT mit seinem homologen Antigen PT a)

Antigen-Verdünnung in mg Virus/ml	Antiserum-Verdünnung b)									
	unverd.	2	4	8	16	32	64	128		
4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0
1,0	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0
0,5	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
0,25	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0,125	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a) Die Zahlen geben von 1 - 5 ansteigende Intensitätsgrade der Präzipitationslinien im Agar-Gelldiffusionstest an;

0 = keine Reaktion; - = nicht getestet.

b) Reziproke Werte.

1 : 128 für die Antiseren gegen die Isolate Y und Q. Die gegen die vier übrigen Isolate gerichteten Antiseren hatten lediglich einen Titer von maximal 1 : 32. Die Nachweisgrenze der Antigene liegt zwischen 0,125 und 0,06 mg Virus pro ml. Lediglich beim Isolat W 14 war eine Konzentration von wenigstens 1 mg/ml Virus für das Auftreten einer Präzipitationslinie nötig. Die optimalen Verhältnisse für den serologischen Nachweis des GMV dürften demnach etwa bei 0,25 bis 0,5 mg/ml Virus und bei einer Antiserum-Verdünnung von 1 : 4 liegen.

4.6.2. Heterologe Teste

Die heterologen serologischen Teste sollten dazu dienen, die serologische Verwandtschaft zwischen den verschiedenen GMV-Isolaten festzustellen. Heterologe Teste werden in der Weise durchgeführt, daß man ein bestimmtes Antiserum mit verschiedenen heterologen Antigenen reagieren läßt, d.h. mit solchen Virus-Isolaten, welche nicht zur Herstellung dieses Antiserums selbst benutzt worden waren. Die Ergebnisse der bei 6 Virus-Isolaten möglichen 30 heterologen Kombinationen sind in Tabelle 16 gemeinsam mit den Werten für die entsprechenden homologen Kombinationen zusammengefaßt. Bei den in der Tabelle aufgeführten Quotienten gibt der Zähler die jeweiligen Antiserum-Titer und der Nenner die entsprechende Antigen-Konzentration an, bei denen noch eine Präzipitationslinie beobachtet werden konnte.

Aus dieser Tabelle lassen sich folgende allgemeine Schlüsse ziehen:

- 1) Die besten Ergebnisse liefert das Antiserum Q, welches bei einem Titer von 1 : 128 mit den heterologen Antigenen bei relativ geringer Viruskonzentration reagiert. An zweiter Stelle folgt das Antiserum Y mit ebenfalls sehr günsti-

Tabelle 16: Ergebnisse der homologen und heterologen
Teste mit Antiseren gegen vier verschiedene
GMV-Isolate und die Virus-Isolate GT und PT a)

Antiserum gegen	Q	Y	KD	W ₁₄	GT	PT
Q	$\frac{128}{0,125}$	$\frac{128}{0,125}$	$\frac{128}{0,125}$	$\frac{128}{0,5}$	$\frac{128}{0,125}$	$\frac{128}{1,0}$
Y	$\frac{64}{0,125}$	$\frac{128}{0,06}$	$\frac{32}{0,125}$	$\frac{32}{1,0}$	$\frac{64}{0,06}$	$\frac{4}{0,25}$
KD	$\frac{32}{0,5}$	$\frac{32}{0,125}$	$\frac{32}{0,125}$	$\frac{32}{2,0}$	$\frac{32}{0,125}$	$\frac{32}{0,5}$
W ₁₄	$\frac{2}{0,06}$	$\frac{4}{2,0}$	$\frac{4}{0,06}$	$\frac{32}{2,0}$	$\frac{4}{0,06}$	$\frac{2}{2,0}$
GT	$\frac{128}{0,25}$	$\frac{128}{2,0}$	$\frac{8}{2,0}$	$\frac{32}{2,0}$	$\frac{32}{2,0}$	$\frac{32}{0,25}$
PT	$\frac{32}{0,125}$	$\frac{32}{1,0}$	$\frac{4}{2,0}$	$\frac{16}{2,0}$	$\frac{32}{4,0}$	$\frac{32}{0,5}$

- a) Der Zähler des Quotienten stellt den reziproken Wert der letzten Antiserum-Verdünnung dar, bei der noch eine Präzipitationslinie im Agar-Gel-diffusionstest auftrat.
Der Nenner gibt die jeweils entsprechende Antigenkonzentration in mg Virus pro ml an.

gen Konzentrations-Beziehungen in allen Kombinationen.

- 2) In den Antiseren Y, Q und GT müssen gemeinsame Antikörper vorhanden sein, da diese mit ihren jeweiligen heterologen Antigenen Y, Q und GT bei relativ hoher Verdünnung sowohl des Antiserums als auch des Antigens unter Bildung eines Präzipitates reagieren. Das bedeutet in anderen Worten, daß diese Virus-Isolate spezifische immunologisch aktive Gruppen gemeinsam haben, so daß sie als serologisch eng verwandt angesehen werden können.
- 3) Das Antiserum gegen das Isolat KD reagiert mit allen heterologen Antigenen zwar mit dem selben Titer wie mit seinem homologen Antigen. Betrachtet man aber die Antigen-Konzentrationen, dann ist relativ hochkonzentriertes Antigen W 14 für diese Reaktion nötig, während mittlere Konzentrationen von 0,5 mg/ml Antigen von den Isolaten PT und Q ausreichen. Die Isolate Y, GT und das homologe Antigen KD reagieren bereits bei 0,125 mg/ml.
- 4) Das Antiserum gegen Isolat PT reagiert bei einem Titer von 1 : 32 mit dem homologen Antigen und den heterologen Antigenen Q, Y und GT, allerdings sind mit Ausnahme von Q hohe Antigen-Konzentrationen dafür Voraussetzung. Eine Reaktion mit den Antigenen KD und W 14 tritt schließlich nur bei hoher Konzentration dieser Antigene und bei geringer Antiserum-Verdünnung auf.
- 5) Das Isolat W 14 nimmt unter allen Isolaten eine Sonderstellung ein, weil sein Antiserum mit den heterologen Antigenen nur bei geringer Antiserum-Verdünnung reagiert. Dieses Ergebnis deutet auf eine entfernte Verwandtschaft zwischen dem Isolat W 14 und den anderen Isolaten hin.

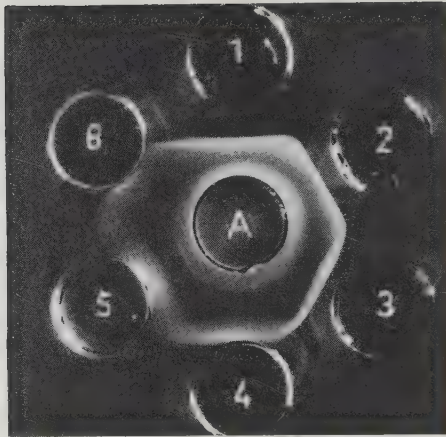


Abbildung 3: Serologische Reaktion im Geldiffusions-
test zwischen Isolat GT und Antiserum
gegen GMV-Q; A = Isolat GT (2 mg/ml);
in den peripheren Löchern Antiserum gegen
GMV-Q, 1 = u.v., 2 = 1/2, 3 = 1/4, 4 = 1/8,
5 = 1/16, 6 = 1/32.

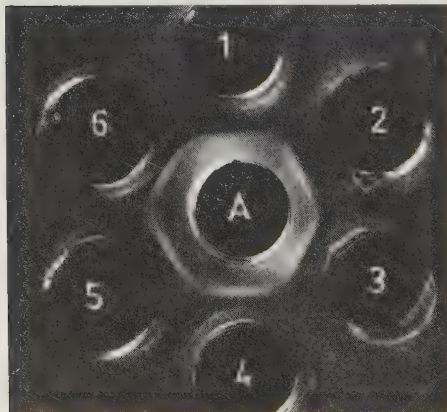


Abbildung 4: Serologische Reaktion im Geldiffusions-
test zwischen Isolat GT und Antiserum
gegen GMV-Y; A = Isolat GT (0,125 mg/ml);
in den peripheren Löchern Antiserum gegen
GMV-Y, 1 = u.v., 2 = 1/2, 3 = 1/4, 4 = 1/8,
5 = 1/16, 6 = 1/32.

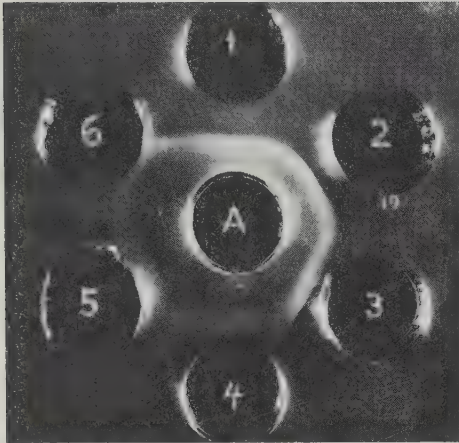


Abbildung 5: Serologische Reaktion im Geldiffusions-
test zwischen GMV-KD und Antiserum gegen
GMV-Y; A = GMV-KD (0,25 mg/ml); in den
peripheren Löchern Antiserum gegen GMV-Y,
1 = u.v., 2 = $1/2$, 3 = $1/4$, 4 = $1/8$,
5 = $1/16$, 6 = $1/32$.

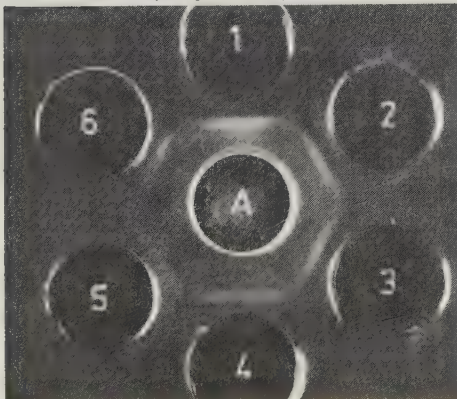


Abbildung 6: Serologische Reaktion im Geldiffusions-
test zwischen GMV-W 14 und Antiserum gegen
GMV-Y; A = GMV-W 14 (3,5 mg/ml); in den
peripheren Löchern Antiserum gegen GMV-Y,
1 = u.v., 2 = $1/2$, 3 = $1/4$, 4 = $1/8$,
5 = $1/16$, 6 = $1/32$.

4.6.3. Kreuzabsorptionsteste

Zur näheren Bestimmung der serologischen Verwandtschaftsverhältnisse wurden Kreuzabsorptionsteste nach der "Intra-Gel-Methode" von VAN REGENMORTEL (1967) durchgeführt.

Beim Kreuzabsorptionstest werden die einzelnen Antiseren zuerst jeweils mit einem heterologen Virusantigen abgesättigt. Diese abgesättigten Antiseren werden dann gegen die verschiedenen Viren getestet. Im Falle einer engen serologischen Verwandtschaft zwischen zwei Viren werden durch die entsprechende heterologe Antiserum-Antigen-Reaktion die gemeinsamen Antikörper vollständig gebunden. Wenn das erschöpfte Antiserum anschließend gegen andere Antigene getestet wird, dann findet in der Regel keine Reaktion mehr statt. Wenn hingegen zur Absättigung ein Virus verwendet worden ist, welches nur wenige oder keine Antikörper aus dem heterologen Antiserum bindet, dann wird ein solches Virus als serologisch entfernt verwandt oder als nicht verwandt bezeichnet. Die auf diese Weise festgestellte serologische Verwandtschaft beruht natürlich auf der Identität der antigen-spezifischen Gruppen der Virus-Hüllprotein-Untereinheiten. Beim Intra-Gel-Absorptionstest (VAN REGENMORTEL, 1967) wird die Erschöpfung des Antiserums im Agar-Gel durchgeführt. Dafür läßt man zuerst das Antigen, welches zur Absättigung benutzt werden soll, in Agar diffundieren (Abb. 2) und füllt anschließend das zu erschöpfende Antiserum nach. Während seiner Diffusion kommt es zur serologischen Reaktion, die als Präzipitationslinie sichtbar wird. Dabei werden alle gemeinsamen Antikörper gebunden, so daß nur die spezifischen Antikörper weiter diffundieren können. Sie lassen sich ihrerseits durch heterologe Antigene nachweisen, die ihnen entgegendiffundieren und mit denen sie dann gegebenenfalls eine Präzipitationslinie bilden.

Für die Kreuzabsorptionsteste wurden die Virus-Antigene in einer Konzentration von 1 mg/ml und die Antiseren in einer Verdünnung von 1 : 8 benutzt. In einer Kontrollversuchs-Serie wurde zur Absättigung der Antiseren an Stelle von Virus-Antigen Tabakpflanzen-Antigen verwendet, welches aus gesunden Tabakpflanzen isoliert wurde. Zu seiner Präparation wurden nicht-infizierte Tabakblätter nach der GMV-Reinigungsmethode von SCOTT (1963) aufgearbeitet. Das nach der dritten hochtourigen Zentrifugation auftretende schwache Sediment wurde resuspendiert und zur Absorption des Antiserums benutzt. Keines der Antiseren ergab eine Präzipitationszone mit dem Tabakpflanzen-Antigen, was zeigt, daß die Seren nur virusspezifische Antikörper enthielten. Dementsprechend reagierten sie nach Absorption mit dem Tabakpflanzen-Antigen in unverminderter Stärke mit den Virus-Antigenen.

Die Ergebnisse der serologischen Tests mit kreuz-absorbierten Antiseren sind in den Tabellen 17 und 18 zusammengefaßt. Man kann aus Tabelle 17 entnehmen, daß nach der Absättigung des W 14-Antiserums mit den 5 heterologen Antigenen beim Rücktest keine Reaktion mehr mit diesem Antigen auftritt. Das bedeutet, daß das Isolat W 14 mit allen anderen Isolaten gemeinsame serologische aktive Gruppen besitzt. Darüberhinaus aber müssen im Antiserum noch W 14-spezifische Determinanten vorkommen, die bei keinem der heterologen Isolate vorhanden sind und daher auch durch die Kreuzabsorption nicht gebunden werden. Daher reagieren die erschöpften W 14-Antiseren stets noch mit ihrem homologen Antigen. Das bedeutet, daß das Isolat W 14 eine eindeutige Spezifität besitzt, die es von allen anderen Isolaten unterscheidet.

Beim Isolat KD fällt auf, daß mit allen Isolaten gemeinsame serologisch aktive Gruppen vorhanden sind, Aber die Determinanten, die durch Kreuzabsorption nicht

gebunden werden, reagieren noch mit den Virus-Antigenen Y, Q und W 14. Das zeigt, daß das Isolat KD zusammen mit den Isolaten Y, Q und W 14 spezifische Determinanten gemeinsam hat.

Das türkische Isolat von Gurke (GT) ist ebenfalls mit allen anderen Isolaten serologisch verwandt. Darüberhinaus muß es aber mit den Isolaten Y und Q spezifische Gruppen gemeinsam haben, die den anderen Isolaten fehlen.

Aus Tabelle 18 kann man ersehen, daß das Isolat Y mit allen heterologen Isolaten eine große Zahl serologisch aktiver Gruppen teilen muß und daß daher eine besonders enge Verwandtschaft mit diesen Isolaten besteht. Das zeigt sich auch im reziproken Test mit dem Antiserum Q, welches nach der Absorption vor allem noch mit dem Antigen Y reagiert. Daneben besitzt das Isolat Q natürlich mit allen anderen Isolaten gemeinsame serologisch aktive Gruppen, wobei zusätzliche Beziehungen zu den Antigenen KD und PT bestehen.

Schließlich fällt Isolat PT völlig aus dem Rahmen, denn das erschöpfte Antiserum gegen Isolat PT reagiert beim Rücktest mit keinem anderen Virusantigen mehr. Man kann annehmen, daß die wenigen spezifischen Antikörper gegen dieses Isolat bei der Absättigung blockiert werden und infolgedessen nicht mehr weiter diffundieren und reagieren können.

4.6.4. Serologischer Nachweis des GMV in Pflanzensaften

Der serologische Nachweis von Pflanzenviren in rohen Preßsäften ist von großer praktischer Bedeutung. Mit seiner Hilfe ist es nämlich möglich, unter Praxisbedingungen bestimmte Viren in Kulturpflanzen rasch nachzuweisen und zu bestimmen. Da das GMV in Pflanzengeweben relativ hohe Konzentrationen erreichen kann,

müßte es sich in Preßsäften gut nachweisen lassen. Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen wurde daher versucht, ein möglichst praxisnahes Nachweisverfahren zu erarbeiten. Zu diesem Zweck wurden mit allen Isolaten und Antiseren entsprechende Versuchsserien durchgeführt, bei denen jeweils geklärte Preßsäfte aus infizierten Tabakblättern und Paprikablättern zum Nachweis verwendet wurden. Paprika wurde deshalb in die Versuche einbezogen, weil er in der Türkei im großen Maßstab angebaut wird und regelmäßig virusbefallen ist. Es muß aber betont werden, daß es sich dabei nicht ausschließlich um reine GMV-Infektionen handeln muß. In vielen Fällen liegen sicher verschiedene Mischinfektionen vor, bei denen serologisch nicht miteinander verwandte Viren beteiligt sind. Das bedeutet, daß dem GMV zwar eine entscheidende, aber nicht die alleinige Bedeutung beizumessen ist.

Die Ergebnisse der Versuche zum Nachweis des GMV in geklärtem Tabakblatt-Preßsaft sind in Tabelle 19 dargestellt. Es zeigt sich dabei, daß es mit einem beliebigen hochtitrigen GMV-Antiserum praktisch ohne Schwierigkeiten möglich ist, auch heterologe GMV-Isolate direkt im Tabakrohsaft nachzuweisen. Entscheidend ist dabei natürlich eine entsprechend hohe Konzentration des Virus-Antigens im Gewebe bzw. Preßsaft. Etwas ungünstiger scheinen die Verhältnisse im Paprika-Blattsaft zu sein (Tabelle 20). Hier ist der direkte Nachweis des GMV bei bestimmten heterologen Antiserum-Antigen-Kombinationen in Frage gestellt, weil offenbar verschiedene Isolate in Paprikapflanzen eine zu geringe Konzentration erreichen. In allen diesen Fällen würde sich durch eine Übertragung des Virus auf Tabak die Zuordnung zum GMV sehr schnell durchführen lassen.

Tabelle 17: Ergebnis der serologischen Teste der zwei kreuzabsorbierten GMV-Antiseren W 14 und KD und des Antiserums des Virus-Isolats GT mit ihren homologen und heterologen Virusantigenen ^{a)}

Antiserum	zur Absättigung benutztes Antigen	Antigene						
		Y	Q	PT	W14	KD	GT	TP
W 14	Y	-	-	-	+	-	-	-
	Q	-	-	-	+	-	-	-
	PT	-	-	-	+	-	-	-
	W14	-	-	-	-	-	-	-
	KD	-	-	-	+	-	-	-
	GT	-	-	-	+	-	-	-
	TP	-	-	-	+	-	-	-
KD	Y	-	-	-	-	-	-	-
	Q	-	-	-	+	-	-	-
	PT	-	+	-	-	-	-	-
	W14	+	+	-	-	-	-	-
	KD	-	-	-	-	-	-	-
	GT	-	-	-	-	-	-	-
	TP	-	-	-	-	-	-	-
GT	Y	-	+	-	-	-	-	-
	Q	-	-	-	-	-	-	-
	PT	+	+	-	-	-	-	-
	W14	+	+	-	-	-	-	-
	KD	+	+	-	-	-	-	-
	GT	-	-	-	-	-	-	-
	TP	-	-	-	-	-	-	-

a) Der Test wurde als Intra-Gel-Test nach VAN REGENMORTEL (1967) durchgeführt;
 + = positive serologische Reaktion (Präzipitationslinie); - = keine serologische Reaktion.

Tabelle 18: Ergebnis der serologischen Teste der zwei kreuzabsorbierten GMV-Antisera Y und Q und des Antiserums des Virus-Isolats PT mit ihren homologen und heterologen Virusantigenen a)

Antiserum	zur Ab- sättigung benutztes Antigen	Antigene						
		Y	Q	PT	W ₁₄	KD	GT	TP
Y	Y	-	-	-	-	-	-	-
	Q	-	-	+	+	-	-	-
	PT	+	+	-	-	-	-	-
	W ₁₄	+	+	-	-	-	-	-
	KD	+	+	-	-	-	-	-
	GT	+	+	-	-	-	-	-
	TP	-	+	-	-	-	-	-
Q	Y	+	+	+	-	+	-	-
	Q	-	-	-	-	-	-	-
	PT	+	+	+	-	+	-	-
	W ₁₄	+	+	+	-	+	-	-
	KD	+	+	+	-	-	-	-
	GT	+	+	-	-	+	-	-
	TP	-	+	-	-	+	-	-
PT	Y	-	-	-	-	-	-	-
	Q	-	-	-	-	-	-	-
	PT	-	-	-	-	-	-	-
	W ₁₄	-	-	-	-	-	-	-
	KD	-	-	-	-	-	-	-
	GT	-	-	-	-	-	-	-
	TP	-	-	-	-	-	-	-

a) Der Test wurde als Intra_Gel-Test nach VAN REGENMORTEL (1967) durchgeführt;
 + = positive serologische Reaktion (Präzipitationslinie); - = keine serologische Reaktion.

Tabelle 19: Ergebnisse des serologischen Nachweises verschiedener GMV-Isolate im Presssaft aus Tabakblättern a)

Antiserum	Antigene						
	geklärte Pressäfte von Tabakpflanzen infiziert mit						
	Y	Q	PT	W 14	KD	GT	GTS b)
Y	3	3	0	2	2	3	Sp.
Q	3	3	1	1	1	3	Sp.
PT	1	1	1	1	1	1	Sp.
W 14	1	1	0	1	1	1	-
KD	2	2	1	2	2	2	-
GT	1	1	1	1	1	1	Sp.

a) Der Test wurde als Agar-Gelddiffusionstest durchgeführt. Die Zahlen geben den Intensitätsgrad der auftretenden Präzipitationslinien an; 0 = keine Reaktion; Sp. = undeutliche Spuren einer schwachen Reaktion mit Pflanzenantigen; 1 - 3 = zunehmende Intensität der virusspezifischen Präzipitationslinien.

b) GTS = Presssaft gesunder Tabakpflanzen, durch Zentrifugation bei ca. 10.000 x g geklärt.

Tabelle 20: Ergebnisse des serologischen Nachweises verschiedener GMV-Isolate in Paprika-Blattsaft a)

Antiserum	Antigene							GPS b)
	Geklärte Pressäfte von Paprikapflanzen infiziert mit							
	Y	Q	PT	W 14	KD	GT		
Y	3	0	0	2	2	3	-	
Q	3	1	1	1	2	3	Sp.	
PT	1	1	1	1	1	1	Sp.	
W 14	1	0	0	1	0	0	-	
KD	2	1	1	2	2	2	Sp.	
GT	3	0	0	1	2	3	Sp.	

a) Der Test wurde als Agar-Geldiffusionstest durchgeführt. Die Zahlen geben den Intensitätsgrad der auftretenden Präzipitationslinien an;
 0 = keine Reaktion; Sp. = undeutliche Spuren einer schwachen Reaktion mit Pflanzenantigen; 1 - 3 = zunehmende Intensität der viruspezifischen Präzipitationslinien.

b) GPS = Pressaft gesunder Paprikapflanzen, durch Zentrifugation bei ca. 10.000 x g geklärt.

4.6.5. Versuche zum Nachweis der Natur multipler Präzipitationslinien

Bei den meisten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Geldiffusionstesten trat nur eine einzige virusspezifische Präzipitationslinie auf. Allerdings konnten in einigen Fällen mehrere nebeneinander liegende Linien beobachtet werden. Das Auftreten solcher multipler Präzipitationsbanden ist ein bekanntes Phänomen in der Pflanzenvirusserologie und wurde z.B. von KLECZKOWSKI (1957) bei Versuchen mit dem TMV-Antigen (A-Protein) des TMV gefunden. Das Auftreten multipler Linien kann auf verschiedene Weise interpretiert werden. Sie können z.B. dadurch entstehen, daß mehrere Antigene im Testsystem vorhanden sind, die sich in Spezifität und (oder) in ihrer Diffusionsgeschwindigkeit voneinander unterscheiden. Daneben besteht die Möglichkeit, daß selbst beim Vorhandensein von nur einem Antigen mehrere Linien auf Grund einer Art von Liesegang-Phänomen auftreten können. Dies geschieht, wenn das serologische System unausgeglich ist, d.h. wenn die verwendeten Konzentrationen von Antiserum und Antigen nicht im Bereich der optimalen Proportionen liegen.

Um Aufschluß über die Natur der bei den verschiedenen GMV-Systemen auftretenden multiplen Banden zu erhalten, wurde zuerst versucht, das Vorhandensein verschiedener Antigene auszuschließen. Es bestand nämlich der begründete Verdacht, daß in einigen Seren Antikörper gegen pflanzeigenes Protein (F_1 -Protein nach DÖRNER et al., 1958) vorhanden waren und daß die gereinigten Virus-Antigenlösungen dieses F_1 -Protein ebenfalls enthielten (siehe Tabellen 19 und 20, letzte Spalte). In einer entsprechenden Versuchsanordnung wurde daher das Antiserum KD, bei dessen Reaktion gelegentlich mehrere Linien auftraten, gegen die Antigene KD, GT, Y und gegen präpariertes F_1 -Protein und

geklärten Tabakrohsaft getestet. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 7 diagrammatisch dargestellt. Im zentralen Loch befindet sich Antiserum gegen das Isolat KD und in den peripheren Löchern die Antigene KD, Y, GT sowie präpariertes F_1 -Protein und geklärter Rohsaft aus gesunden Pflanzen. Dabei trat bei den Antigenen KD, Y und GT eine sehr deutliche, bei den pflanzenproteinhaltigen Proben jedoch keinerlei Präzipitationslinien auf.

Das Ausbleiben einer Reaktion bei GTP und GTS bedeutet, daß im Antiserum KD nur virusspezifische Antikörper vorhanden sind und daß keine Antikörper gegen pflanzeigenes Protein vorzukommen scheinen. Demnach dürfte das Auftreten mehrerer Präzipitationslinien beim Antiserum KD sehr wahrscheinlich auf einer Art Liesegang-Phänomen beruhen und nicht auf dem Vorhandensein mehrerer Antigene.

In einem weiteren Test wurde versucht, diese Ergebnisse durch entsprechende Absättigungsversuche weiter zu erhärten. Zu diesem Zweck wurde das Antiserum KD mit Pflanzenproteinen abgesättigt, weil durch diese Absättigung die vermuteten Antikörper gegen Pflanzenproteine absorbiert werden können. Anschließend wurde dann das absorbierte Antiserum gegen die Antigene KD, Y GT und gegen präpariertes Pflanzenprotein und geklärten Tabakrohsaft getestet. Man sieht in Abbildung 8, daß trotz der Absättigung mit F_1 -Protein im Test mit den Antigenen KD, Y und GT noch eine sehr deutliche Reaktion auftritt. Im Test mit präpariertem F_1 -Protein und geklärtem Tabakrohsaft ist wiederum keinerlei Reaktion zu beobachten.

In diesem Zusammenhang darf noch einmal darauf hingewiesen werden, daß sowohl bei den Kreuzabsorptionstesten (Tabellen 17 und 18) als auch bei den serologischen Testen mit den rohen Preßsäften (Tabellen 19 und 20) nur in einigen Fällen eine sehr schwache, undeutliche Präzipitationslinie auftrat.

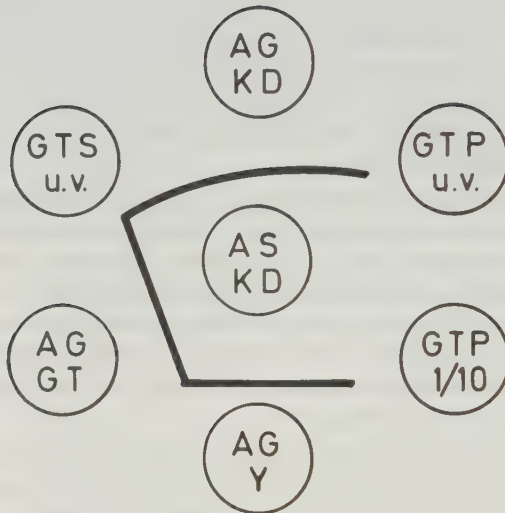


Abbildung 7: Serologischer Nachweis von pflanzeigenem Antigen als mögliche Ursache für multiple Präzipitationslinien.

GTP = Gesunder Tabaksaft entsprechend der Reinigungsmethode von SCOTT (1963) aufgearbeitet. Dieses Material enthält u.a. die F_1 -Pflanzenproteine,
GTS = Saft gesunder Tabakpflanzen ausgepreßt und durch Niedrigtouren-Zentrifugation geklärt,

KD = Isolat KD

Y = Isolat Y

GT = Isolat GT

AS-KD = Antiserum gegen Isolat KD

u.v. = unverdünnt.

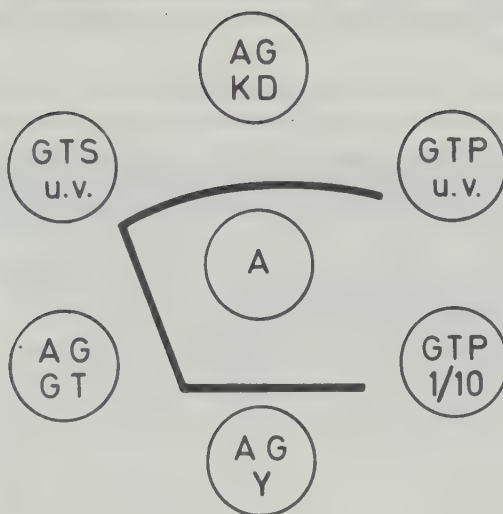


Abbildung 8: Serologischer Nachweis von pflanzeneigenen Antigenen mit Hilfe eines absorbierten Antiserums.

GTP = Gesunder Tabaksaft entsprechend der Reinigungsmethode von SCOTT (1963) aufgearbeitet. Dieses Material enthält u.a. die F_1 -Pflanzenproteine,
 GTS = Saft gesunder Tabakpflanzen ausgepresst und durch Niedrigtouren-Zentrifugation geklärt,
 KD = Isolat KD
 Y = Isolat Y
 GT = Isolat GT
 u.v. = unverdünnt.

Methodik: Das mutmaßliche Antigen GTP wurde unverdünnt in das mittlere Loch einpipetiert und nach 24 Std. mit Antiserum-KD nachgefüllt (A), wobei gleichzeitig die Antigene in die äußeren Löcher eingefüllt wurden.

Zusammengenommen sprechen alle diese Ergebnisse sehr dafür, daß es sich bei den beobachteten Fällen multipler Linienbildung um eine Art Liesegang-Phänomen handeln muß.

Wenn man die entsprechenden Systeme unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, dann zeigt sich in der Tat, daß mehrere Linien ausschließlich bei Antigen- oder Antiserum-Überschuß auftreten und bei optimalen Konzentrationsverhältnissen nicht zu beobachten sind.

4.7. Dichtegradientenzentrifugation und Dichtegradientenfraktionierung

Die Analyse der 6 Virus-Isolate durch Zentrifugation im 10 bis 40 %igen Saccharosegradienten ist in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigt sich dabei, daß 5 der untersuchten Isolate (GMV-Q, GMV-W 14, GMV-Y, GMV-KD und Isolat GT) nach 4-stündiger Zentrifugation eine deutliche Virus-Bande etwa in der Mitte der Zentrifugen-Röhrchen ergeben. Die obere Begrenzung dieser Bande liegt bei allen 5 Isolaten in der gleichen Höhe, nämlich unter den angegebenen Versuchsbedingungen genau 3,9 cm vom Boden entfernt. Die Unterschiede in der Dichte und der Breite der Banden beruhen auf verschiedenen hohen Virus-Konzentrationen. Sie sind daher ohne wesentliche Bedeutung für den Nachweis, daß die physikalischen Partikel der 5 Virus-Isolate in ihren Sedimentationseigenschaften identisch sein müssen. Die diffuse Ausbreitung der Virus-Banden nach unten ist eine bekannte und bei vielen Viren auftretende Erscheinung und wird auf Aggregation der Partikel zurückgeführt.

Abbildung 9 zeigt weiterhin, daß sich das Isolat PT (Nr. 1) völlig abweichend verhält. An Stelle der deutlichen Viruszone in der Mitte des Röhrchens findet man hier eine diffuse und sehr breite Bande, die nur

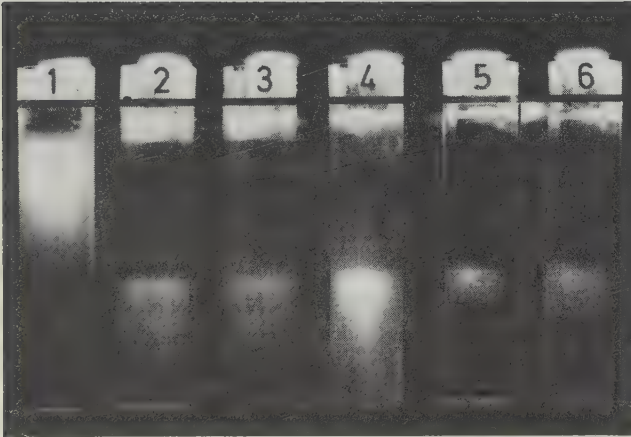


Abbildung 9: Gurkenmosaikvirus-Isolate nach 240 Min.
Zentrifugation bei 27.000 U/Min. im
10 bis 40 %igen Saccharose-Gradienten.

1 = Isolat PT; 2 = GMV-Q; 3 = GMV-W 14; 4 = Isolat GT;
5 = GMV-Y; 6 = GMV-KD.

wenig in den Gradienten eingewandert ist und die sich vom Meniskus bis in die Mitte des Gradienten erstreckt. Daneben tritt noch eine sehr schwache und undeutliche Zone ca. 4 mm tiefer als bei den übrigen 5 Isolaten auf.

Die Untersuchung der fraktionierten Proben auf ihre optische Dichte, ihre serologische Aktivität und ihre Infektiosität ergab, daß bei den 5 Isolaten alle drei Aktivitäten in den gleichen Fraktionen auftreten. In Abbildung 10 ist diese Übereinstimmung zwischen optischer Dichte und Infektiosität für das Isolat GMV-Y dargestellt. Man sieht, daß die Maxima für beide Eigenschaften gut miteinander korrelieren. Gleichsinnige Ergebnisse wurden für alle übrigen Isolate mit Ausnahme des Isolates PT erhalten. Bei der entsprechenden Analyse des Isolates PT hingegen ergab sich überraschenderweise, daß die optische Dichte und serologische Aktivität im wesentlichen auf die diffuse, milchig-weiße Bande in der oberen Hälfte des Zentrifugenröhrchens beschränkt sind. Die entsprechenden Fraktionen erwiesen sich jedoch interessanterweise alle als nicht-infektiös. Die Infektiosität des Isolates PT ließ sich nur in der unteren schwachen Zone nachweisen.

4.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Proben resuspendierter, infektiöser Sedimente des Isolates GT zeigen nach Schrägbedampfung sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 35 bis 38 nm. Abbildung 11 zeigt einen typischen Ausschnitt aus einer solchen Aufnahme, die bei einer 6.000-fachen Primärvergrößerung aufgenommen wurde.

In den Proben der infektiösen Sedimente des Isolates PT fanden sich ebenfalls ausschließlich sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 35 - 38 nm. In Abbildung 12 ist der Ausschnitt einer Aufnahme eines Sprühtropfens des Isolates PT dargestellt, die bei einer 18.000-fachen Primärvergrößerung aufgenommen wurde.

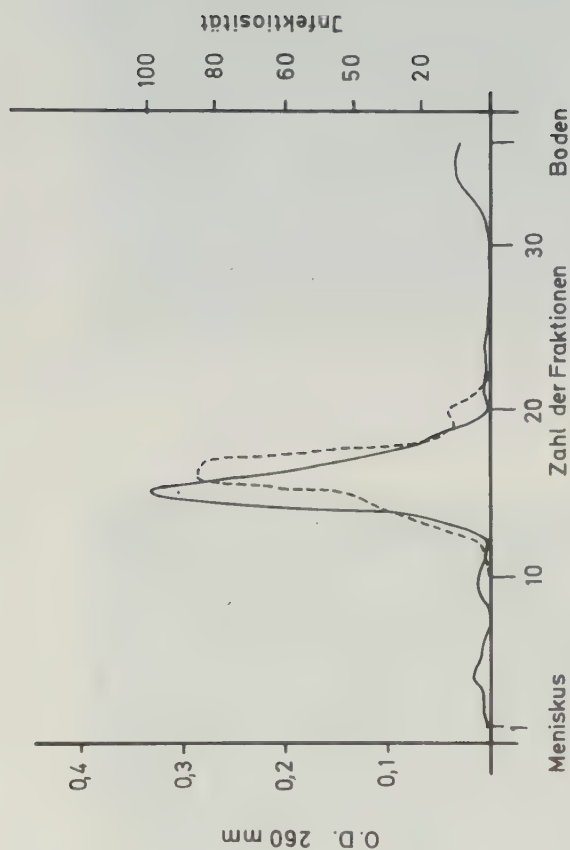


Abbildung 10: Sedimentationsprofil des Gurkenmosaikvirus (Isolat Y) in einem 10 bis 40 %igen Saccharose-Gradienten.

-- Anzahl der Lokalläsionen pro Blatt von Vigna sinensis L.

— Optische Dichte bei 260 nm.

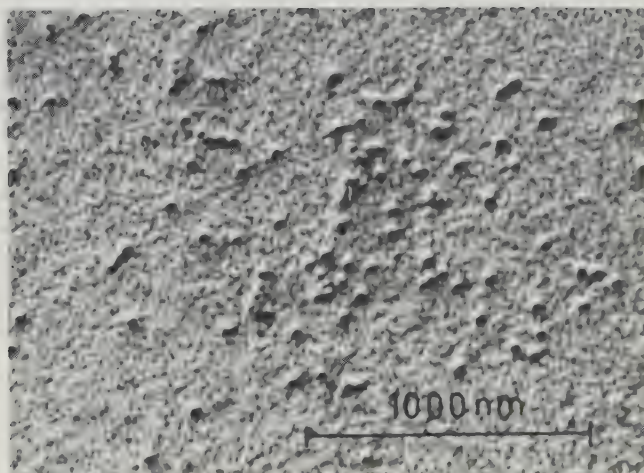


Abbildung 11: Elektronenoptische Aufnahme von charakteristischen Partikeln des Isolates GT (Vergrößerung etwa 54.000-fach).

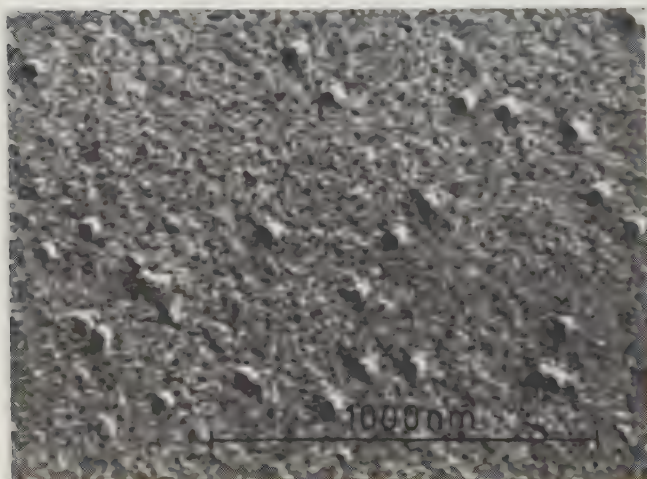


Abbildung 12: Elektronenoptische Aufnahme von charakteristischen Partikeln des Isolates PT (Vergrößerung etwa 72.000-fach).

Auf Grund der Form und Größe ihrer physikalischen Partikel kann man daher annehmen, daß es sich in beiden Fällen um Isolate des Gurkenmosaikvirus handelt, zumal entsprechende Proben der GMV-Isolate Y und Q die gleichen Partikel enthalten.

5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die biologische und serologische Charakterisierung verschiedener Isolate des Gurkenmosaikvirus. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollten auch die Eigenschaften und die Natur von zwei türkischen Virus-Isolaten bestimmt werden, die man auf Grund ihrer natürlichen Wirtspflanzen und der an ihnen erzeugten Symptome als Stämme des Gurkenmosaikvirus (GMV) ansehen konnte. Zu diesem Zweck wurden diese Isolate zuerst im Hinblick auf ihre biologischen und physikalischen Eigenschaften zusammen mit vier bereits in der Literatur beschriebenen GMV-Isolaten untersucht und verglichen. Auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften und der Symptome, die sie auf entsprechenden Testpflanzen hervorriefen, konnte man bereits annehmen, daß es sich bei den türkischen Isolaten vermutlich um zwei verschiedene Isolate des GMV handelte. Ihre physikalischen Eigenschaften zeigten nämlich keinen großen Unterschied zu denen der vier Vergleichsstämme und die Symptome auf Tabak- und Chenopodium-Arten wichen ebenfalls nicht von denen der Vergleichsstämme ab. Besondere Erwähnung verdienen allerdings die Reaktionen, welche die türkischen Isolate auf dem Lokalläsionen-Wirt Vigna sinensis hervorrufen. Und zwar produziert das Isolat GT die üblichen punktförmigen Lokalläsionen auf den Primärblättern ohne nachfolgende systemische Erkrankung, wie es nach SILL und WALKER (1952 a) für die meisten GMV-Stämme charakteristisch ist. Völlig abweichend verhält sich hingegen das Isolat PT, denn es erzeugt keine Lokalläsionen auf den Primärblättern, sondern eine systemische Erkrankung der neu zuwachsenden Folgeblätter. Dieses Verhalten ist zwar atypisch, doch keineswegs ungewöhnlich für das GMV, denn bereits SILL und WALKER (1952 b) fanden bei einem ihrer Isolate, nämlich dem GMV- W 14, ein sehr ähnliches Verhalten und auch PAULUS et al. (1962) isolierten von Paprika ein Isolat, welches

Cowpea systemisch infiziert. Trotz dieser symptomatologischen Gemeinsamkeiten beider Isolate auf Vigna sinensis besteht dennoch ein wesentlicher Unterschied bei der Wirtspflanze Gurke. Interessanterweise gelingt es nicht, das Isolat PT auf Gurke zu übertragen, während dies mit GMV-W 14 ohne Schwierigkeiten möglich ist. Aber auch diese Abweichung ist bereits bei einigen Virus-Isolaten beobachtet worden, welche von Nicht-Cucurbitaceen isoliert wurden und sich nachträglich als GMV-Stämme erwiesen, obwohl sie nicht auf Gurke übertragbar waren. Das gilt vor allem für bestimmte Isolate von Chrysanthemen (NOORDAM, 1952; GROGAN et al., 1963) und Tomaten (BLENCOWE und CALDWELL, 1949). Schließlich wurde es auch für GMV-Isolate von Melonen und Commelina gigas (ANDERSON, 1951 a) berichtet, welche nach der Passage über Paprika (ANDERSON, 1951 b) ebenfalls nicht auf Gurke übertragen werden konnten.

Das Isolat PT wurde ursprünglich von Paprika isoliert, bei dem es die sog. "Reisigkrankheit" hervorruft, eine Erkrankung, die in den türkischen Paprikaanbaugebieten, besonders in Westanatolien, ziemlich große Schäden verursacht. Im Hinblick auf das abweichende Verhalten dieses Isolates auf Gurke lag es daher nahe, in einer Art reziproken Test festzustellen, wie sich die übrigen GMV-Vergleichsstämme auf Paprika verhalten. Interessanterweise stellte sich jedoch hierbei heraus, daß diese fünf Isolate bei Paprika die gleichen Symptome der "Reisigkrankheit" hervorrufen wie das Isolat PT selbst. Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß alle untersuchten Isolate auf Grund ihrer biologischen Eigenschaften ohne Schwierigkeiten in die Gruppe des GMV eingeordnet werden können.

Eine größere Einheitlichkeit des Verhaltens der GMV-Isolate ergab sich beim Vergleich drei verschiedener Methoden, die von verschiedenen Autoren zur Reinigung des GMV entwickelt worden waren (TOMLINSON et al., 1959;

GROGAN et al., 1963; SCOTT, 1963). Es stellte sich nämlich dabei heraus, daß für alle Isolate eine einzige gemeinsame Reinigungsmethode benutzt werden konnte. Diese Methode, nach SCOTT (1963) erwies sich für alle Isolate als gut geeignet und ermöglichte es, gereinigtes Virusmaterial in größeren Mengen zu präparieren, wie es für die serologischen Untersuchungen erforderlich war. Weiterhin zeigte sich, daß alle Isolate am besten aus frischem Blattmaterial aufgearbeitet werden, weil durch Einfrieren der infizierten Blätter ein erheblicher Teil der Infektiosität verlorengeht. Dagegen verträgt gereinigtes Virusmaterial die Aufbewahrung in gefrorenem Zustand sehr gut, so daß es vorteilhafterweise in kleinen Portionen eingefroren und bis zur Benutzung aufgehoben werden kann.

Als sehr kritische Faktoren für die Resuspension des gereinigten GMV haben sich die Art und die Molarität des Puffermediums erwiesen (SCOTT, 1963). Bei Verwendung eines ungeeigneten Puffers kann das GMV zum großen Teil unlöslich bleiben oder sogar ausgefällt und denaturiert werden. Bei der Klärung dieser Abhängigkeit stellte sich heraus, daß für alle Isolate der gleiche Puffer, nämlich 0,005 M Boratpuffer pH 9,0, verwendet werden konnte, den SCOTT (1963) bei seinen Untersuchungen mit dem Isolat Y entwickelt hatte und der sich auch anschließend für das Isolat Q als am besten geeignet erwies (FRANCKI et al., 1966). Für die Verwandtschaftsbeziehungen zwar unwesentlich, aber dennoch in diesem Zusammenhang erwähnenswert, sind die Ergebnisse der Bestimmung der Virusaussbeuten. Es zeigten sich in Abhängigkeit vom Alter der infizierten Pflanzen und von der Jahreszeit die üblichen Schwankungen in der Ausbeute, die zwischen 90 und 300 mg Virus pro 1 kg Blattmaterial ohne Rippen lag, was etwa den Werten entspricht, die auch FRANCKI et al. (1966) beim GMV-Q fanden.

Alle bisher diskutierten Ergebnisse kann man als eine Art Vorklärung der Zugehörigkeit der untersuchten Isolate zum GMV ansehen. Die entscheidenden Kriterien zur Klärung der Verwandtschaft liefern jedoch die serologischen Untersuchungen. Sie wurden ausschließlich im Agar-Gel-diffusionstest nach OUCHTERLONY (1949) durchgeführt und bilden das Hauptgewicht der vorliegenden Arbeit. In Übereinstimmung mit einigen Arbeiten allerjüngsten Datums (FRANCKI et al., 1966; SCOTT, 1968; VAN REGEN-MORTEL, 1967) ergaben sich bei der Herstellung von Antiseren gegen die verschiedenen GMV-Isolate keine grundsätzlichen Probleme. Das dürfte in erster Linie auf die Anwendung der von SCOTT (1963) entwickelte Reinigungsmethode für das GMV zurückzuführen sein, mit deren Hilfe die Gewinnung konzentrierter und stabiler Antigenlösungen möglich wurde. Damit wurde die wichtigste Voraussetzung für die Gewinnung spezifischer Antiseren erfüllt. Es darf betont werden, daß in einigen früheren Arbeiten (z.B. TOMLINSON et al., 1959; SCHLEGEL, 1960) von Schwierigkeiten bei der Reinigung des GMV berichtet wird. Man kann heute annehmen, daß sowohl die relative Instabilität des GMV unter ungeeigneten Extraktionsbedingungen als auch die Gegenwart eines Hemmstoffes in Blattextrakten (FRANCKI, 1964) dafür verantwortlich zu machen sind.

Aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten serologischen Versuchen ergibt sich als erstes, daß trotz Injektion höchster Antigenkonzentrationen im Kaninchen Antiseren produziert werden, deren Titer 1/128 nicht übersteigt. Über ähnliche Resultate berichten auch SCOTT (1968) und FRANCKI et al. (1966). Damit unterscheidet sich das GMV deutlich von den meisten anderen polyedrischen Viren, wie z.B. dem turnip yellow virus (MACLEOD und MARKHAM, 1963) und dem cowpea mosaic virus (AGRAWAL und MAAT, 1964), mit denen Antiseren mit einem sehr viel höheren Titer produziert werden können. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die verschiedenen

GMV-Isolate alle in gleicher Weise sehr schlechte Immunogene sind und es erhebt sich die Frage nach der Ursache für dieses Verhalten. Man könnte daran denken, daß die relative Instabilität des GMV, d.h. seine Neigung zur Degradation bei noch relativ niedrigen Temperaturen und Salzkonzentrationen dafür verantwortlich ist. Weitere Versuche, z.B. mit dem isolierten Hüllprotein, müssen zeigen, ob diese Annahme berechtigt ist.

Trotz der angeführten Schwierigkeiten war es möglich, die zur Feststellung der serologischen Verwandtschaft notwendigen homologen und heterologen Teste und Absättigungsversuche erfolgreich durchzuführen. Dabei zeigten alle sechs untersuchten Isolate Kreuzreaktion miteinander. In den Absättigungsversuchen stellte sich heraus, daß die Isolate Y, Q und GT neben serologisch gemeinsamen Determinanten auch noch spezifische aktive Gruppen besitzen. Das bereits symptomatologisch abweichende Isolat W 14 reagierte allerdings nur bei höheren Antigen-Konzentrationen und dann stets mit niedrigem Titer mit den übrigen Antiseren und zeichnete sich dementsprechend auch durch spezifische immunologisch aktive Gruppen aus. Das Isolat KD besitzt sowohl mit den Isolaten Y und Q als auch andererseits mit dem Isolat W 14 gemeinsame serologische Gruppen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von FRANCKI et al. (1966) konnte schließlich eine nähere Verwandtschaft des GMV-Q mit dem GMV-Y festgestellt werden.

Die Versuche mit dem Antiserum gegen das Isolat PT erwiesen sich durchweg als unbefriedigend, da es bereits im homologen Test nur einen Titer von 1/32 ergab und weil dann in den heterologen Kombinationen mit den übrigen Virus-Antigenen nur sehr schwache Reaktionen, selbst bei hohen Antiserum-Antigen-Konzentrationen, auftraten. Auch bei den Absättigungsversuchen konnten mit dem Antigen bzw. dem Antiserum PT keine klaren

Ergebnisse erzielt werden, weil höchstwahrscheinlich die im Serum vorhandenen wenigen PT-spezifischen Gruppen bei der Absättigung blockiert wurden. Man kann annehmen, daß dieses abweichende Verhalten des Isolates PT im serologischen Test seine abweichende biologischen Eigenschaften widerspiegelt und auch mit seinem ungewöhnlichen Verhalten im Dichtegradienten zusammenhängt.

Der unerwartete Befund, daß das Virus sehr instabil ist und zerfällt, liefert eine plausible Erklärung für das serologisch stark abweichende Verhalten des Isolates PT im Vergleich zu den übrigen Isolaten. Das Auftreten der sehr breiten und nichtinfektösen, aber serologisch aktiven Bande im oberen Teil des Gradienten zeigt eindeutig, daß dieses Virus relativ instabil sein muß. Die Partikel der übrigen fünf Isolate bleiben unter den angegebenen Versuchsbedingungen intakt und sedimentieren als Partikelpopulation. Beim Isolat PT muß man hingegen annehmen, daß der größte Anteil seiner Partikel zerfällt, wobei natürlich ihre biologische Aktivität verloren geht. Das Hüllprotein dieser Partikel wird dabei frei und bleibt während der Zentrifugation im oberen Teil des Gradienten, da das freie Hüllprotein aller bisher untersuchten Viren eine sehr viel geringere Sedimentationskonstante als das entsprechend intakte Virus hat (KNIGHT, 1963). Weiterhin ist es sicher, daß das PT-Hüllprotein weitgehend denaturiert ist, denn es liegt nicht in klarer Lösung, sondern in einer trüben Suspension vor, wie es für denaturierte und daher unlösliche Virus-Proteine charakteristisch ist. Dieses eigenartige Verhalten des Isolates PT dürfte sowohl für seine geringe Immunogenität verantwortlich sein als auch die Erklärung für die geringe immunologische Verwandtschaft mit den übrigen GMV-Isolaten liefern. Da bei denaturierten Proteinen die immunologische aktiven Oberflächen im Vergleich zum nativen Protein sehr stark verändert sind,

ergibt sich natürlich eine sehr viel geringere serologische Verwandtschaft mit den stabilen Vergleichs-Isolaten. Man kann postulieren, daß sich das Hüllprotein des Isolates PT biochemisch-strukturell durch Aminosäure-Austausche sehr deutlich von denen der übrigen GMV-Isolate unterscheiden muß. Auf diese Aminosäure-Austausche läßt sich natürlich auch die Instabilität des Isolates PT zurückführen, denn sie verändern die Ladungs- und Bindungsverhältnisse innerhalb und zwischen den Hüllprotein-Untereinheiten. Die Instabilität von Viruspartikeln beruht physiko-chemisch gesehen nämlich auf relativ schwachen Bindungen zwischen den Protein-Untereinheiten selbst und zwischen diesen und der Virus-RNS. Der Nachweis dieser Korrelationen beim Isolat PT muß zukünftigen biochemischen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die Bedeutung serologischer Untersuchungen beruht vor allem auf ihrer Anwendbarkeit unter praxisnahen Bedingungen. Die unter diesem Gesichtspunkt durchgeführten Versuche zeigen, daß es möglich ist, mit den entsprechenden Antiseren die verschiedenen GMV-Stämme mit großer Sicherheit in Rohsäften infizierter Tabak- und Paprikapflanzen serologisch nachzuweisen. Das bedeutet offensichtlich, daß das GMV im infizierten Gewebe in relativ hohen Konzentrationen vorhanden ist. Über Versuche zum Nachweis des GMV in Rohsäften wurde bisher von TOLLINSON et al. (1959) und von GOGAN und KIMBLE (1962) berichtet. Die Möglichkeit des schnellen serologischen Nachweises des GMV in verdächtigen Pflanzen dürfte von praktischer Bedeutung sein, weil damit das ebenso umständliche wie unzuverlässige Verfahren des Nachweises des GMV mit Testpflanzen ersetzt werden kann.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung schrägbedampfter Präparate ergab, daß die Isolate GT und PT durch sphärische Partikel mit einem Durchmesser von

35 bis 38 nm charakterisiert sind. Die bisher für das Gurkenmosaikvirus publizierten Durchmesser für be-
dampfte Partikel betragen 35 nm (SILL et al., 1952),
36,2 nm (BETTO et al., 1964), 40 nm (GÜNTÜRK et al.,
1957) und 42 nm (FRANCKI et al., 1966), wobei die
Unterschiede sowohl auf die Präparationsmethode als
auch auf die unterschiedliche Kalibrierung der Meß-
werte zurückgeführt werden können. Dementsprechend
kann man die Isolate GT und PT auch auf Grund der
Form und Größe ihrer Partikel als Stämme des GMV
ansehen.

Zum Schluß darf noch einmal betont werden, daß auf
Grund aller untersuchten Eigenschaften das Virus-Isolat
PT sehr wahrscheinlich ein Stamm des GMV ist, während
dies für das Isolat GT mit Sicherheit festgestellt
werden kann.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Natur von zwei Virus-Isolaten aus der Türkei, eines von Gurke (GT) und eines von Paprika (PT), aufzuklären. Dafür wurden die biologischen, physikalischen und serologischen Eigenschaften dieser Isolate mit denen von vier verschiedenen Gurkenmosaikvirus-Isolaten (Y, Q, W 14, KD) verglichen, welche in der Literatur bereits beschrieben worden sind.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

- 1) Das türkische Isolat GT erzeugte an den entsprechenden Testpflanzen Symptome, wie sie für das Gurkenmosaikvirus charakteristisch sind.
- 2) Das Isolat PT unterscheidet sich in der Weise von allen anderen Isolaten, daß es nicht auf Gurke übertragbar ist und Vigna sinensis L. systemisch infiziert.
- 3) Die thermale Inaktivierung liegt für das Isolat GT zwischen 75 und 80 °C und für das Isolat PT zwischen 70 und 75 °C. Der Verdünnungsendpunkt für beide beträgt 1 : 1.000 000. Die Infektiosität beider Isolate geht in eingefrorenen Blättern weitgehend verloren, während sie bei gereinigten Präparaten nach dem Einfrieren fast vollständig erhalten bleibt.

Die für das GMV entwickelte Reinigungsmethode nach SCOTT (1963) erwies sich auch für die beiden türkischen Isolate als geeignetste Präparationsmethode. Pro 1 kg Blattmaterial konnten zwischen 90 bis 300 mg Virus isoliert werden.

- 4) Im Saccharose-Dichtegradienten sedimentierten fünf der untersuchten Isolate als deutliche Bande, wobei die Infektiosität, die serologische Aktivität und

die optische Dichte sehr gut miteinander übereinstimmten. Das Isolat PT erwies sich als sehr instabil, wobei durch Zerfall der Virus-Partikel große Mengen an denaturiertem Virus-Hüllprotein auftraten.

- 5) Im Elektronenmikroskop erwiesen sich die Partikel beider Isolate als sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 35 bis 38 nm. Sie entsprechen damit in Form und Größe den charakteristischen Viruspartikeln aller bisher beschriebenen GMV-Isolate.
- 6) Auf Grund der serologischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Isolate Y, Q und GT nahe miteinander verwandt sind. Dagegen haben Isolat W 14 und KD neben den anderen Isolaten gemeinsame serologische Gruppen mit sehr deutlich nachweisbar eigenen, serologisch spezifischen Determinanten. Infolge der Instabilität des Isolates PT konnten für das Isolat PT trotz Anwendung verschiedener serologischer Tests keine eindeutigen serologischen Verwandtschaftsbeziehungen ermittelt werden.
- 7) Alle untersuchten GMV-Isolate lassen sich in geklärten Rohsäften von Tabak und Paprika mit ausreichender Sicherheit schnell und einfach serologisch nachweisen, so daß dieses Verfahren auch in der Praxis anwendbar ist.
- 8) Auf Grund aller ermittelten biologischen, physikalischen und serologischen Eigenschaften ist das Isolat PT sehr wahrscheinlich ein Stamm des GMV, während dies für das Isolat GT mit Sicherheit festgestellt werden konnte.

7. LITERATUR

- | | | |
|---|--------|---|
| AGRAWAL, H. und
MAAT, D.T. | 1964 | Serological relationships among polyhedral plant viruses and its production of high titred anti-sera. <i>Nature</i> <u>202</u> , 674-675 |
| ANDERSON, C.W. | 1951 a | Some preliminary observations on cucurbit viruses in Florida. <i>Pl. Dis. Reprtr.</i> <u>35</u> , 233-234 |
| ANDERSON, C.W. | 1951 b | Further observations of some cucurbit viruses from central Florida. <i>Pl. Dis. Reprtr.</i> <u>35</u> , 396-398 |
| BENNETT, C.W. | 1940 | Acquisition and transmission of viruses by dodder (<i>Cuscuta subinclosa</i>). <i>Phytopathology</i> <u>30</u> , 2 |
| BENNETT, C.W. | 1944 | Studies of dodder transmission of plant viruses. <i>Phytopathology</i> <u>34</u> , 905-932 |
| BETTO, E.,
BELLI, G.G.,
CONTI, G.G. und
GIUSSANI, G. | 1964 | Sulla purificazione e sulla visualizzazione al microscopio elettronico del virus del mosaico del cetriolo. <i>Phytopath. Z.</i> <u>51</u> , 85-89 |
| BEWLEY, N.F. and
CORBETT, W. | 1930 | The control of cucumber and tomato mosaic diseases in glashouses by the of clean seed. <i>Ann. appl. Biol.</i> <u>17</u> , 260-266 |
| BLENCOWE, J.W. and
CALDWELL, J. | 1949 | Aspermy - a new virus disease of the tomato. <i>Ann. appl. Biol.</i> <u>36</u> , 320-326 |
| BRASSE, M.K. | 1951 | Density gradient centrifugation: A new separation technique. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> <u>73</u> , 1847 |

- BRAKKE, M.K. 1955 Zone elektrophoresis of dyes, proteins and viruses in density-gradient columns of sucrose solution. Archs. Biochem. Biophys. 55, 175-190
- BRAKKE, M.K. 1958 Properties, assay, and purification of wheat streak mosaic virus. Phytopathology 48, 439-445
- BRAKKE, M.K. 1960 Density gradient centrifugation and its application to plant viruses. Adv. Virus Res. 7, 193-224
- CAMPBELL, R.N. 1964 Radish mosaic, a crucifer virus serologically related to strains of Bean pod mottle virus and to Squash mosaic virus. Phytopathology 54, 1418-1424
- CHAMBERLAIN, E.E. 1939 Cucumber mosaic (Cucumis virus 1 of Smith 1937). New Zealand j. sci. technol. 21, 73A-90A
- CHAMBERLAIN, E.E. 1948 Virus diseases of tree tomato (Cyphomandra betacea Sendt). 1. Cucumber mosaic (Cucumis virus 1 of Smith 1937). New Zealand j. sci. technol. A 29, 256-260
- COSTA, A.S. 1944 Multiplication of viruses in the dodder Cuscuta campestris. Phytopathology 34, 151-162
- DOOLITTLE, S.P. 1920 The mosaic disease of cucurbits. US. dep. agric., Bull. 879, 1-67
- DOOLITTLE, S.P. 1925 Further studies on the overwintering and dissemination of cucurbit mosaic. J. agric res. 31, 1-58
- WALKER, M.N.

- | | | |
|---|------|--|
| DORNER, R.W.,
KAHN, A.,
WILDMAN, S.G. | 1958 | Proteins of green leaves. VIII.
The distribution of fraction I
protein in the plant kingdom as
detected by precipitin and ul-
tracentrifugal analysis.
Biochim. biophys. Acta <u>29</u> , 240-245 |
| FORGHANI, B. | 1966 | Untersuchungen über Viroseen an
Ölkürbis (Cucurbita pepo L.).
Diss. Gießen. |
| FORGHANI, B.,
SÄNGER, H.L.,
GROSSMANN, F. | 1966 | Viroseen an Ölkürbis. NachrBl. dt.
PflSchutzdienst (Braunschweig)
<u>18</u> , 113-116 |
| FRANCKI, R.I.B. | 1964 | Inhibition of cucumber mosaic virus
infectivity by leaf extracts.
Virology <u>24</u> , 193-199 |
| FRANCKI, R.I.B.,
RANGLES, J.W.,
CHAMBERS, T.C.,
WILSON, S.B. | 1966 | Some properties of purified
Cucumber mosaic virus (Q Strain).
Virology <u>28</u> , 729-741 |
| GOVIER, D.A. | 1957 | The properties of tomato aspermy
virus and its relationship with
cucumber mosaic virus. Ann. appl.
Biol. <u>45</u> , 62-73 |
| GRAHAM, D.C. | 1957 | Cross-Protection between strains
of tomato aspermy virus and cu-
cumber mosaic virus. Virology <u>3</u> ,
427-428 |
| GROGAN, R.G.,
KIMBLE, K.A. | 1962 | Serological identification of
cucumber mosaic virus in crude
extracts from infected plants.
Abs. in Phytopathology <u>52</u> , 734. |

- | | | |
|---|------|--|
| GROGAN, R.G.,
UYEMETO, J.K.,
KIMBLE, K.A. | 1963 | Evidence that tomato aspermy and Cucumber mosaic viruses are serologically unrelated. Virology <u>21</u> , 36-42 |
| GÜNTÜRK, S.,
ÖZKAN, M.,
BASKAYA, H. | 1957 | Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Mischinfektionen von Cucumber Virus 1 und Beta Virus 4 am Spinat in der Türkei. Phytopath. Z. <u>29</u> , 75-78 |
| HEIN, A. | 1957 | Beiträge zur Kenntnis der Viruskrankheiten an Unkräutern. III. Das Gurkenmosaikvirus. Phytopath. Z. <u>29</u> , 204-229 |
| HEINZE, K. | 1952 | Virusübertragungsversuche mit Blattläusen auf Dahlien, Gurken, Zwiebeln, Wasserrüben und einigen anderen Pflanzen. Z. Pflkrankh. Pflschutz PflPath. <u>59</u> , 4-13 |
| HILDEBRAND, E.M. | 1945 | The dodder vector of woody plant viruses. Pl. Dis. Reprtr. <u>29</u> , 196-197 |
| HOLLINGS, M. | 1955 | Investigation of chrysanthemum viruses 1. Aspermy flower distortion. Ann. appl. Biol. <u>43</u> , 86-102 |
| HOLLINGS, M. | 1956 | <u>Chenopodium amaranticolor</u> as a test plant for plant viruses. Plant Path. <u>5</u> , 57-60 |
| KAHN, R.P.,
SCOTT, H.A. | 1964 | Serological relationship of Cucumber mosaic virus and certain virus isolates that incite Amaryllis mosaic symptoms. Phytopathology <u>54</u> , 360-362 |

- | | | |
|--------------------------------------|------|---|
| KAPER, J.M. | 1965 | Some physical and chemical properties of Cucumber mosaic virus (Strain Y) and its isolated ribonucleic acid. <i>Virology</i> <u>27</u> , 54-72 |
| DIENER, T.O.,
SCOTT, H.A. | | |
| KASSANIS, B. | 1952 | Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with viruses. <i>Ann. appl. Biol.</i> <u>39</u> , 358-369 |
| KLECZKOWSKI, A. | 1957 | A preliminary study of tobacco mosaic virus by the gel diffusion precipitation test. <i>J. gen. Microbiol.</i> <u>16</u> , 405-417 |
| KLINKOWSKI, M.,
USCHDRAWAIT, H.A. | 1968 | Das Gurkenmosaik. - Pflanzliche Virologie, Band II; Die Virose des europäischen Raumes, Teil 2, Akademie Verlag, Berlin. |
| KNIGHT, C.A. | 1955 | Are Cucumber Viruses 3 and 4 strains of Tobacco mosaic virus? <i>Virology</i> <u>1</u> , 261-267 |
| KNIGHT, C.A. | 1963 | Chemistry of viruses. In: <i>Protoplasmatologia. Handbuch der Protoplasmaforschung</i> . Wien, Springer-Verlag. |
| KOVACHEVSKY,
Iv. Chr. | 1942 | Die Reissigkrankheit der Paprikapflanze (<i>Capsicum annuum</i>). <i>Z. PflKrankh. PflPath. PflSchutz</i> <u>50</u> , 298-308 |
| KÖHLER, E.,
KLINKOWSKI, M. | 1954 | Viruskrankheiten; in <i>Handbuch der Pflanzenkrankheiten</i> , herausgegeben von O. Appel und H. Richter, Bd. II, 1. Lieferung, S. 668-674, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg |

- | | | |
|---|------|---|
| KUNTZ, J.E.,
WALKER, J.C. | 1947 | Virus inhibition by extracts of spinach. <i>Phytopathology</i> <u>37</u> , 561-579 |
| LAWSON, R.H. | 1967 | Relationships among Tomato aspermy, aspermy-related viruses from Chrysanthemum, and two strains of Cucumber mosaic virus. <i>Virology</i> <u>32</u> , 357-362 |
| MACLEOD, R.
MARKHAM, R. | 1963 | Experimental evidence of a relationship between turnip yellow mosaic virus and wild cucumber mosaic virus. <i>Virology</i> <u>19</u> , 674-675 |
| MUELLER, C.W. | 1966 | Cucumber mosaic virus; cause of a mosaic disease of Canna. <i>Pl. Dis. Reptr.</i> <u>50</u> , 899-901 |
| NOORDAM, D. | 1952 | Virusziekten bij crysanten in Nederland. <i>Tijdschr. Planteziekten</i> <u>58</u> , 121-190 |
| ORELLANA, R.G.,
QUACQUARELLI, A. | 1968 | Sunflower mosaic caused by a strain of Cucumber mosaic virus. <i>Phytopathology</i> <u>58</u> , 1439-1440 |
| OUCHTERLONY, O. | 1949 | Antigen-antibody reactions in gels. <i>Arch. Kemi. Min. Geol.</i> <u>26B</u> , Nr. 14 |
| PAULUS, A.O.,
KENDRICK, J.B., JR.,
WEATHERS, L.G. | 1962 | Cucumber mosaic virus in pepper in California. <i>Abs. in Phytopathology</i> <u>52</u> , 25 |
| RAINIO, A.J. | 1941 | Untersuchungen über Cucumis Virus 1. Erreger der Kräuselkrankheit auf Gurkenpflanzen. <i>Staatl. Landw. Versuchstätigkeit</i> Nr. 109, Helsinki (Zit. Hein, A., 1957: <i>Phytopath. Z.</i> <u>29</u> , 204-229) |

- SÄNGER, H.L., 1962 Transmission of unstable viruses from liquid-nitrogen frozen plant tissue. Abs. in Phytopathology 52, 750
- SCHLEGEL, D.E. 1960 Highly infectious phenol extracts from tobacco leaves infected with cucumber mosaic virus. Virology 11, 329-338
- SCHMELZER, K. 1957 Beiträge zur Kenntnis der Übertragbarkeit von Viren durch Cuscuta-Arten. Phytopath. Z. 28, 1-56
- SCHMELZER, K., 1967 Symptome des Gurkenmosaikvirus an Kürbissen. Nachr. Bl. f. Dt. Pfl. Schutzdienst 21, 109-110
- SCHMELZER, K., 1966 Das Gurkenmosaikvirus als Ursache schwerster Schädigungen des Gurkenbaus in kühlen Sommern. Gartenbau 13, 181-184
- SCOTT, H. 1963 Purification of Cucumber Mosaic Virus. Virology 20, 103-106
- SILL, W.H., 1952 Electron microscopy of Cucumber virus. Phytopathology 42, 420-422
- BURGER, W.C.,
STAHMANN, M.A.,
WALKER, J.C.
- SILL, W.H., 1952 a Cowpea an assay host for Cucumber virus. Phytopathology 42, 328-330
- WALKER, J.C.
- SILL, W.H., 1952 b A strain of cowpea susceptible to systemic infection by various strains of common Cucumber mosaic virus. Abs. in Phytopathology 42, 442
- WALKER, J.C.

- | | | |
|---|------|---|
| SMITH, K.M. | 1957 | A textbook of plant virus disease.
London, Boston, 2. Auflage |
| SUTIC, D. | 1959 | Die Rolle des Paprikasamens bei
der Virusübertragung.
Phytopath. Z. <u>36</u> , 84-93 |
| SZIRMAI, J. | 1948 | Virus betegsegek terjedese a
vetőmag utján. Mitt. Fak. Garten-
u. Weinbau Univ. Agrarwiss.
Budapest <u>12</u> , 165-181 |
| TJALLINGII, F. | 1952 | Onderzoekingen over de mozaiek-
ziekte van de augurk (<i>Cucumis
sativus</i> L.). Diss. Wageningen |
| TOMLINSON, J.A.,
SHEPHERD, R.J.,
WALKER, J.C. | 1959 | Purification, properties, and
serology of Cucumber mosaic virus.
Phytopathology <u>49</u> , 293-299 |
| TREMAINE, J.H. | 1966 | Serological identification of a
strain of cucumber mosaic virus
from <i>Prunus</i> . Abs. in Phytopathology
<u>56</u> , 152 |
| TREMAINE, J.H. | 1968 | Some properties of a cucumber
mosaic virus strain isolated from
<i>Prunus</i> spp. Phytopathology <u>58</u> ,
797-801 |
| USCHDRAWIT, H.A. | 1955 | <u>Chenopodium quinoa</u> als Testpflanze
für das Gurkenmosaik.
NachrBl. dt. Pflschutzdienst
(Braunschweig) <u>7</u> , 151-152 |
| VAN REGENMORTEL,
M.H.V. | 1961 | Zone electrophoresis and particle
size of Cucumber mosaic virus.
Virology <u>15</u> , 221-223 |
| VAN REGENMORTEL,
M.H.V. | 1966 | The problem of contaminating plant
antigens in virus preparations,
viruses of plants. Proc. Intern. Conf.
Plant Viruses, Wageningen, July 1965,
213-217, North Holland Publishing Co.,
Amsterdam |

- VAN REGENMORTEL, 1967 Biochemical and biophysical
M.H.V. properties of Cucumber mosaic
virus. Virology 31, 391-396
- VAN REGENMORTEL, 1967 Serological studies of naturally
M.H.V. occurring strains and chemically
induced mutants of Tobacco mosaic
virus. Virology 31, 467-480
- VAN SLOGTEREN, 1958 Multiple antigenicity in tobacco
D.H.M. plants infected with viruses,
notably strains of cucumber
mosaic virus. Actes Congr. Sci.
Internat. Tabac 2 Brussels 1958,
144-149
- WHIPPLE, O.C., 1941 Strains of cucumber mosaic virus
WALKER, J.C. pathogenic on bean and pea.
Jour. Agr. Res. 62, 27-60

Dem Direktor des Institutes für Phytopathologie der
Justus Liebig-Universität, Herrn Professor Dr.
F. Großmann, danke ich für die Überlassung und
Förderung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H.L. Sänger sei für die Betreuung
und fachliche Kritik bei der Anfertigung der Arbeit
sowie für die Durchführung der elektronenmikroskopischen
Untersuchungen herzlich gedankt.

Außerdem möchte ich mich bei allen Angehörigen des
Institutes für Phytopathologie für ihre stete und
freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Lebenslauf

- 10.7.1941 als Tochter des Staatsbeamten Halil Ibrahim Izgi und seiner Ehefrau Ismet, geb. Ibrahim in Nazilli/Türkei geboren.
- 1948 - 1953 Besuch der Grundschule in Aydin.
- 1953 - 1959 Besuch der Mädchen-Oberschule in Izmir.
- September 1959 Abschluß der Oberschule mit dem Abitur.
- 1959 - 1963 Studium an der Landwirtschaftlichen Fakultät der Ege-Universität in Bornova-Izmir.
- Oktober 1963 Abschluß als Diplom-Agraringenieurin.
- Dezember 1963 - als Lehrerin in der landwirtschaftlich-technischen Berufsschule in Beydere/
Mai 1964 Manisa tätig.
- Mai 1964 - als Assistentin im Institut für
Oktober 1965 Phytopathologie und Landwirtschaftliche Botanik (Fitopatoloji ve Ziraat Botanik Kürsüsü) der Landwirtschaftlichen Fakultät der Ege-Universität beschäftigt.
- November 1965 - Besuch des Deutschkurses für Ausländer
März 1966 der Justus Liebig-Universität in Gießen.
- März 1966 Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Phytopathologie der Justus Liebig-Universität in Gießen.

